

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO**

**“ Estudios referentes a la utilización del nemátodo
Strelkovimermis spiculatus Poinar & Camino, 1986
(Nematoda: Mermithidae) como agente de control
biológico de culícidos (Diptera: Culicidae)”**

Trabajo de Tesis Doctoral

María Fernanda Achinelly

**Director: Juan José García
Codirector: Nora Beatriz Camino**

Año 2004

**A mi familia, especialmente a Christian y a Juani,
y a mis amigos por muy lejos que estén.**

AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis, el Dr. Juan José García, por permitirme la realización de este estudio, gracias a su continua colaboración, conocimiento y dirección permanente.

A mi codirectora, la Dra. Nora Beatriz Camino, por su colaboración y su aporte en la identificación de los nemátodos.

A mis compañeros de laboratorio: Ana Clara, Andrea, Augusto, Claudia, Gerardo, Gustavo, Luis, Mariana, Vanesa y Victoria, por ayudarme de una u otra manera en la realización de la tesis y por la generosidad que me brindaron durante la etapa de redacción.

También quiero agradecerle a Gustavo por haberme ayudado con las fotos y a Victoria por su colaboración desinteresada durante los primeros años de este estudio.

A la directora del Cepave, la Dra. Alda González por permitirme la realización del doctorado en dicho Instituto.

A la cátedra de parasitología, especialmente a Graciela por su continua colaboración.

A mis compañeros del Cepave por la ayuda en diversos aspectos de esta tesis, en especial a la Dra. Estivariz por su colaboración con las figuras.

A mi familia por haberme acompañado y ayudado incondicionalmente en toda esta etapa.

INDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES	11
1. Importancia sanitaria de los culícidos	11
2. Situación en la Argentina	13
3. Control de culícidos	15
4. Enemigos naturales de culícidos	16
5. Situación actual del conocimiento de parásitos y patógenos de culícidos en la Argentina	18
6. Nemátodos asociados a insectos	19
7. Familia Mermithidae	19
7.1. Mermítidos parásitos de culícidos	20
7.2. <i>Strelkovimermis spiculatus</i>	22
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
1. Área de estudio	26
2. Prospección de <i>S. spiculatus</i> en criaderos de culícidos	26
2.1. Ambientes artificiales	26
2.2. Ambientes permanentes	26
2.3. Ambientes temporarios	26
3. Recolección de culícidos	33
4. Detección y procesamiento de los culícidos parasitados	33
5. Instalación y mantenimiento de las colonias del nemátodo y culícidos en el laboratorio	34
5.1. Cría de culícidos	34
5.1.1. <i>Aedes aegypti</i>	34
5.1.2. <i>Culex pipiens</i>	35
5.2. Cría de <i>S. spiculatus</i>	35
6. Utilización de <i>A. aegypti</i> y <i>C. pipiens</i> como hospedadores para	

la cría del nemátodo <i>S. spiculatus</i>	42
6.1. Efecto de la variación del número de estados preparásitos de <i>S. spiculatus</i> sobre la prevalencia en las larvas de <i>A. aegypti</i> y <i>C. pipiens</i>	42
6.2. Susceptibilidad de los estadios larvales de <i>A. aegypti</i> y <i>C. pipiens</i> al nemátodo <i>S. spiculatus</i>	42
7. Producción masiva de estados postparásitos (L4) de <i>S. spiculatus</i>	43
8. Producción de estados preparásitos (L2) en los cultivos de <i>S. spiculatus</i>	45
8.1. Producción de estados preparásitos de <i>S. spiculatus</i> en cultivos inundados semanalmente	45
8.2. Producción de estados preparásitos de <i>S. spiculatus</i> en cultivos inundados permanentemente	46
9. Efecto de la variación del tiempo de conservación de los cultivos de <i>S. spiculatus</i> en la producción e infectividad de estados preparásitos	46
10. Longevidad de las formas adultas de <i>S. spiculatus</i>	47
11. Evaluación de ciertos factores que pueden afectar la viabilidad e infectividad de los estados preparásitos de <i>S. spiculatus</i>	47
11.1. Presencia de agentes patógenos en cultivos de <i>S. spiculatus</i>	47
11.2. Efecto de la temperatura y el tiempo, sobre la supervivencia, longevidad e infectividad de los estados preparásitos del nemátodo	48
11.3. Efecto de la calidad del agua de los criaderos de los culícidos sobre la supervivencia, longevidad e infectividad de los estados preparásitos de <i>S. spiculatus</i>	48
11.4. Efecto de la acción depredadora de copépodos sobre los estados preparásitos de <i>S. spiculatus</i>	50
12. Espectro de hospedadores culícidos y no culícidos susceptibles a infecciones por <i>S. spiculatus</i> en el laboratorio	52

12.1. Susceptibilidad de hospedadores culícidos a <i>S. spiculatus</i> en el laboratorio.	52
12.2. Susceptibilidad de hospedadores no culícidos a <i>S. spiculatus</i> en el laboratorio	52
13. Introducción del nemátodo <i>S. spiculatus</i> en criaderos naturales de culícidos	53
13.1. Área de aplicación de los estados preparásitos del nemátodo <i>S. spiculatus</i>	53
13.1.1 Ambientes artificiales	53
13.1.2 Ambientes permanentes	54
13.1.3 Ambientes temporarios	54
13.2. Metodología utilizada en la liberación de los estados preparásitos del nemátodo <i>S. spiculatus</i>	56
14. Efecto de <i>S. spiculatus</i> en infecciones bacterianas en <i>C. pipiens</i>	57
14.1. Mortalidad larval por bacteriosis en poblaciones naturales de <i>C. pipiens</i>	57
14.2. Interacción entre la bacteria y el nemátodo <i>S. spiculatus</i>	57
RESULTADOS	59
1. Prospección de <i>S. spiculatus</i> en criaderos de culícidos	59
2. Utilización de <i>A. aegypti</i> y <i>C. pipiens</i> como hospedadores para la cría del nemátodo <i>S. spiculatus</i>	61
2.1. Efecto de la variación del número de estados preparásitos de <i>S. spiculatus</i> sobre la prevalencia en las larvas de <i>A. aegypti</i>	61
2.2. Efecto de la variación del número de estados preparásitos de <i>S. spiculatus</i> sobre la prevalencia en las larvas de <i>C. pipiens</i>	62
2.3. Susceptibilidad de los estadios larvales de <i>A. aegypti</i> a <i>S. spiculatus</i>	63
2.4. Susceptibilidad de los estadios larvales de <i>C. pipiens</i> a <i>S. spiculatus</i>	63

3. Producción masiva de estados postparásitos (L4) de <i>S. spiculatus</i>	65
4. Producción de estados preparásitos (L2) en cultivos de <i>S. spiculatus</i>	67
4.1. Producción de estados preparásitos de <i>S. spiculatus</i> en cultivos inundados semanalmente	67
4.2. Producción de estados preparásitos de <i>S. spiculatus</i> en cultivos inundados permanentemente	67
5. Efecto de la variación del tiempo de conservación de los cultivos de <i>S. spiculatus</i> en la producción e infectividad de estados preparásitos	71
6. Longevidad de las formas adultas de <i>S. spiculatus</i>	73
7. Evaluación de ciertos factores que pueden afectar la viabilidad e infectividad de los estados preparásitos de <i>S. spiculatus</i>	73
7.1. Presencia de agentes patógenos en cultivos de <i>S. spiculatus</i>	73
7.2. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la supervivencia, longevidad e infectividad de los estados preparásitos	75
7.3. Efecto de la calidad del agua de los criaderos de culícidos sobre la supervivencia, longevidad e infectividad de los estados preparásitos de <i>S. spiculatus</i>	79
7.3.1. Capacidad infectiva de <i>S. spiculatus</i> en sitios de cría del culícido <i>C. pipiens</i>	79
7.3.2. Viabilidad de los estados preparásitos de <i>S. spiculatus</i> en agua de zanjas de desagües pluviales y domiciliarios	80
7.3.3. Capacidad infectiva de <i>S. spiculatus</i> en agua proveniente de sitios de cría del culícido <i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	81
7.3.4. Capacidad infectiva de <i>S. spiculatus</i> en sitios de cría de los culícidos <i>Ochlerotatus crinifer</i> y <i>Psorophora ferox</i>	81
7.3.5. Parámetros químicos del agua de los sitios de cría	81

7.4. Efecto de la acción depredadora de copépodos sobre los estados preparásitos de <i>S. spiculatus</i>	82
8. Espectro de hospedadores culícidos y no culícidos susceptibles a infecciones por <i>S. spiculatus</i> en el laboratorio	85
8.1. Susceptibilidad de hospedadores culícidos a <i>S. spiculatus</i> en el laboratorio	85
8.2. Susceptibilidad de hospedadores no culícidos a <i>S. spiculatus</i> en el laboratorio	88
9. Introducción de <i>S. spiculatus</i> en criaderos naturales de culícidos	90
9.1 Ambientes artificiales	91
9.2 Ambientes permanentes	93
9.3 Ambientes temporarios	93
10. Efecto de <i>S. spiculatus</i> en infecciones bacterianas en <i>C. pipiens</i>	96
10.1. Mortalidad larval por bacteriosis en poblaciones naturales de <i>C. pipiens</i>	96
10.2. Interacción entre la bacteria y el nemátodo <i>S. spiculatus</i>	96
DISCUSIÓN	98
CONCLUSIONES	113
BIBLIOGRAFÍA	114

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la potencialidad del nemátodo *Strelkovimermis spiculatus* Poinar & Camino, 1986, como biocontrolador de culícidos en condiciones naturales.

El área de estudio abarcó diferentes sitios de cría de culícidos situados en los partidos de Berazategui, Berisso, Ensenada y La Plata, Provincia de Buenos Aires. La búsqueda del nemátodo *S. spiculatus* se realizó en poblaciones naturales de culícidos, en ambientes permanentes y temporarios, artificiales y naturales. El nemátodo se halló parasitando larvas de *Culex chidesteri* Dyar, *C. dolosus* Lynch Arribalzaga, *C. maxi* Dyar, *Ochlerotatus albifasciatus* (Macquart), *Psorophora ciliata* (Fabricius) y *P. cyanescens* (Coquillett). Los mayores índices de prevalencia se alcanzaron en *O. albifasciatus*, en cuyas poblaciones se observaron epizootias naturales cercanas a 90%.

Cuando se evaluaron los culícidos *Aedes aegypti* Linné y *Culex pipiens* Linné como hospedadores alternativos del nemátodo *S. spiculatus*, se observó que los valores de infección variaron entre 72 y 100%, para las diferentes dosis de preparásitos por hospedador utilizadas (3, 5, 8 y 10:1 L2/hospedador) en ambos culícidos. Si bien se alcanzaron elevados porcentajes de infección en ambos hospedadores, *A. aegypti* resultó mejor hospedador alternativo, debido a su período de desarrollo relativamente más breve respecto de *C. pipiens* y la facilidad para mantenerlo en el laboratorio.

El estadio II fue el más adecuado para ser utilizado en la cría del nemátodo *S. spiculatus*, debido a la susceptibilidad superior al 90% y a la reducida mortalidad de los ejemplares parasitados, antes de llegar a el estadio IV.

La producción de estados postparásitos (L4) en larvas de *A. aegypti*, varió entre 1,0 y 3,5 gramos a diferentes dosis. El valor más elevado de L4 de *S. spiculatus* obtenido (3,5 gramos) se alcanzó con la dosis 10:1 L2/hopedador.

El número total de formas preparásitas (L2) obtenidas en los cultivos a través de las sucesivas inundaciones semanales, varió entre $0,1$ y $1,2 \times 10^6$ para las 3 relaciones de sexo estudiadas. La mayor eclosión de formas preparásitas se alcanzó en la primera inundación de los cultivos para todas las relaciones de sexo. El número de preparásitos juveniles disminuyó con las sucesivas inundaciones. Sin embargo la producción de estados preparásitos de *S. spiculatus* en cultivos inundados permanentemente fue considerablemente inferior con un promedio de $0,6 \times 10^5$ L2. Los preparásitos eclosionados en cultivos inundados semanal y permanentemente, conservaron en todo momento la capacidad de infectar con porcentajes de infección que superaron el 60%, constituyendo un atributo positivo de *S. spiculatus* como agente potencial de control biológico de culícidos.

La mayor producción de L2 en los cultivos con un gramo de nemátodos enterrados para las 4 relaciones de sexo estudiadas, se obtuvo cuando los cultivos se inundaron al cumplirse 5 semanas de almacenamiento. Los preparásitos fueron infectivos en todos los cultivos almacenados entre 5 y 20 semanas, habiéndose obtenido porcentajes de parasitismo que variaron entre 78 y 95%.

Algunos factores afectaron la viabilidad e infectividad del nemátodo *S. spiculatus* en el laboratorio. Entre ellos se citan la presencia de dos hongos patógenos que atacaron los estados postparásitos y adultos del nemátodo. Las infecciones se observaron a las 48-72 hs posteriores a la emersión de las L4 del nemátodo a partir de las larvas de los culícidos.

La temperatura fue otro de los factores que afectó la viabilidad de las L2 de *S. spiculatus*. Los preparásitos expuestos a las cuatro temperaturas conservaron la capacidad de infectar con valores de prevalencia entre 70 y 100% en larvas de *A. aegypti*.

El efecto de las diferentes calidades de agua de los criaderos de culícidos sobre la viabilidad e infectividad de *S. spiculatus* se determinó previo a la introducción del nemátodo en los ambientes. En este caso se observó que el parasitismo por el nemátodo varió considerablemente al realizar las infecciones

en agua proveniente de las zanjas de desagüe pluvial y domiciliario disminuyendo de 89,3% (0% agua zanja) a 15,7% (100% agua de zanja) en las larvas de *C. pipiens* y de 91,6% a 5,0% en las larvas de *A. aegypti*. Las muestras de agua provenientes de las zanjas de desagüe domiciliario presentaron valores elevados de fósforo y amonio respecto del resto de las muestras de agua proveniente de otros ambientes.

Entre los factores bióticos se evaluó el efecto de la acción depredadora de copépodos presentes en los ambientes temporarios del sistema *S. spiculatus* - *O. albifasciatus*, sobre los preparásitos de *S. spiculatus*, donde se determinó que las cinco especies de copépodos evaluadas depredaron L2 del nemátodo. Los adultos machos y hembras de *Mesocyclops annulatus* (Wierzejski, 1892) y los juveniles consumieron entre 93 y 100% de los preparásitos. Densidades de 50 copépodos por litro redujeron en un 40%, la prevalencia de *S. spiculatus* en larvas de *A. aegypti* en el laboratorio.

Las especies de culícidos susceptibles a *S. spiculatus* fueron 13. Las larvas de estadios más jóvenes (I y II) fueron más susceptibles al nemátodo. *Strelkovimermis spiculatus* no parasitó a la mayoría de los organismos acuáticos evaluados. La única excepción la constituyeron larvas de dípteros de la familia Chironomidae y Chaoboridae.

Al introducir el nemátodo en criaderos naturales de culícidos, se observó que fue capaz de parasitar *A. aegypti*, *Culex apicinus* (Philippi) y *C. pipiens* con elevados valores de prevalencia, produciendo la reducción de la densidad larval. Sin embargo los resultados no fueron similares al liberar el nemátodo en zanjas de desagüe pluvial y domiciliario y en ambientes temporarios sometidos a fluctuaciones del Río de La Plata.

Los resultados obtenidos demostraron que el nemátodo *S. spiculatus* presenta características que lo señalan como un real agente para controlar especies de culícidos, inclusive cuando su eficiencia es variable dependiendo del culícido y el ambiente.

INTRODUCCIÓN

Los culícidos constituyen uno de los grupos de insectos con mayor número de especies. Son responsables de provocar enfermedades como el paludismo, filariasis, dengue, fiebre amarilla y varias encefalitis, la mayoría graves para el hombre. En la Argentina encontramos varias especies de culícidos de importancia sanitaria, aunque este número podría elevarse considerablemente, si se incrementan los estudios sobre los culícidos vectores de arbovirus.

Existen diferentes estrategias de control de las larvas y adultos de culícidos incluyendo métodos culturales, químicos y biológicos. Aunque la utilización de insecticidas químicos ha sido una de las medidas de prevención y control más efectiva, su aplicación prolongada ha ocasionado severos inconvenientes en el ambiente, debido a la elevada toxicidad que producen y al rápido desarrollo de resistencia en las poblaciones tratadas. Por tales motivos el control biológico de culícidos, a través de la utilización de patógenos, parásitos y depredadores, ha recibido particular atención en los últimos años.

Los nemátodos y entre ellos los pertenecientes a la familia Mermithidae, constituyen un importante grupo de parásitos de culícidos. Unas pocas especies han sido intensamente estudiadas como potenciales agentes de control biológico, debido a su elevada especificidad y letalidad para sus hospedadores.

Entre los mermítidos en la Argentina, se han descrito hasta el presente solo dos especies parásitas de culícidos, *Strelkovimermis spiculatus* Poinar & Camino, 1986, en larvas de *Ochlerotatus albifasciatus* (Macquart) (Poinar & Camino, 1986) e *Hydromermis* sp., en larvas de *Psorophora ferox* (Von Humboldt) (Camino, 1989), ambos en ambientes de la Provincia de Buenos Aires.

Strelkovimermis spiculatus ha sido estudiado con mayor profundidad, aunque las investigaciones se han limitado casi exclusivamente al laboratorio.

El interés en este nemátodo, radica en que se adapta muy bien al ciclo de vida de sus hospedadores, tolera niveles elevados de salinidad y presenta una

mayor tolerancia a permanecer latente por largos períodos de sequía del ambiente. Asimismo provoca importantes epizootias en poblaciones naturales del culícido de las inundaciones, *O. albifasciatus*, el cual constituye una verdadera plaga en amplias áreas de la Argentina, particularmente en la Provincia de Buenos Aires.

Las características bio-ecológicas de este nemátodo y la capacidad de provocar altos niveles de parasitismo en el campo, lo convierten en un excelente candidato a ser utilizado como agente de control biológico de culícidos.

En este estudio se ofrece la información complementaria sobre la biología de *S. spiculatus* y la susceptibilidad de numerosas especies de culícidos y de la fauna asociada, presente en los criaderos. Además se ofrece una metodología eficiente para la producción a mayor escala de *S. spiculatus* y se presentan las primeras evaluaciones de este parásito, como agente de control biológico de culícidos en la naturaleza.

ANTECEDENTES

1. Importancia sanitaria de los culícidos

La Familia Culicidae (Insecta: Diptera) incluye más de 3500 especies en el mundo, la mayoría de reconocida importancia sanitaria. Los estados inmaduros de los culícidos se desarrollan en una amplia variedad de ambientes acuáticos naturales y artificiales, permanentes o temporarios (Laird, 1988). Las hembras de la mayoría de los culícidos necesitan ingerir sangre de aves y mamíferos para el desarrollo de sus huevos. Debido a este comportamiento, los culícidos han recibido particular atención desde el punto de vista sanitario, por ser vectores de un amplio espectro de parásitos y patógenos (virus, protozoos y nemátodos) que pueden transmitir a través de sus picaduras a otros animales y al hombre. Son responsables de transmitir los agentes etiológicos de paludismo, filariasis y varias arbovirosis (dengue, fiebre amarilla y encefalitis) la mayoría severas y en ocasiones fatales para el hombre.

El paludismo o malaria es causado por protozoos pertenecientes al género *Plasmodium* y es transmitido de persona a persona por mosquitos del género *Anopheles*. La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que 300 a 500 millones de personas son infectadas anualmente de paludismo, provocando de uno a dos millones de muertes, principalmente en niños menores de cinco años (OMS, 2003).

El dengue es una arbovirosis transmitida al hombre por mosquitos y es provocada por un virus ARN de la Familia Flaviviridae que posee cuatro serotipos (Den1, Den2, Den3 y Den4). Los culícidos *Aedes aegypti* Linné, y *A. albopictus* (Skuse) constituyen los principales vectores del dengue. Más de 2,5 millones de personas en el mundo viven en áreas de riesgo de contraer dengue en regiones tropicales y subtropicales. Anualmente, el número de casos de dengue en sus dos manifestaciones, clásico y hemorrágico, supera los 50 millones, provocando alrededor de 20.000 muertes por año (OPS, 2004). En

América circulan los cuatro serotipos y los casos de dengue han aumentado en forma exponencial de 66000 en el año 1980 a 717000 en 1998 (OPS, 2000).

La fiebre amarilla es una arbovirosis provocada por otro flavivirus. Posee dos ciclos diferentes: la fiebre amarilla urbana y la selvática. En la fiebre amarilla urbana el culícido *A. aegypti* es el responsable de la transmisión del virus de persona a persona. Si bien en zonas endémicas la tasa de mortalidad por fiebre amarilla es menor al 5%, en situaciones epidémicas los niveles de mortalidad puede superar el 50% (Benenson, 1995). El norte de América del Sur es en la actualidad, la zona más afectada por fiebre amarilla (Goddard, 2000), aunque recientemente la OMS ha recomendado a los países del cono sur de América, incluida la Argentina, la vacunación masiva de la población en riesgo. La fiebre amarilla selvática es normalmente una enfermedad de los monos y otros animales silvestres, pudiendo infectar al hombre ocasionalmente, cuando este se introduce en la selva. Entre los mosquitos responsables de la transmisión se encuentran los pertenecientes a los géneros *Haemagogus* y *Aedes* (Goddard, 2000).

Dentro del nombre de encefalitis, se agrupan una serie de arbovirosis transmitidas por los culícidos a aves y mamíferos, incluido el hombre. Existen diferentes tipos, entre las más importantes se encuentran la Encefalitis Equina del Este, Equina del Oeste, San Luis, Equina de Venezuela, LaCrosse, y la del Virus del Nilo Occidental. La Encefalitis Equina del Este es una de las más severas, pudiendo provocar una mortalidad entre 30 y 60% en équidos y en humanos (Goddard, 2000).

La filiarisis es una enfermedad causada por nemátodos filarioideos. Entre ellos los parásitos más importantes son *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877) y *Brugia malayi* (Brug, 1927), que son transmitidos al hombre por diferentes especies de culícidos (Marquardt *et al.*, 2000). Existen 1100 millones de personas en más de 76 países en el mundo que viven en áreas de riesgo de filiarisis, en las cuales hay 120 millones de personas infectadas en la actualidad (OMS, 2004). La filiarisis bancroftiana se encuentra ampliamente distribuido en el continente americano (Marquardt *et al.*, 2000). Otra filaria, *Dirofilaria immitis*

(Leidy, 1856) es responsable de la filariasis del corazón de los perros provocando severos daños en estos animales y en escasas situaciones en el hombre (García, 2001).

Los culícidos también son responsables de pérdidas importantes en la actividad agrícola-ganadera y turística en amplias áreas del planeta, cuando la densidad de adultos alcanza niveles elevados. Dificultan y encarecen la recolección manual de frutas y verduras, reducen la producción de leche y carne del ganado y afectan notablemente las actividades al aire libre en las áreas turísticas (McClelland, 1984).

2. Situación en la Argentina

En la Argentina se han citado más de 200 especies de culícidos (Darsie & Mitchell, 1985) aunque el número se reduce sensiblemente al considerar las especies reconocidas como vectores o las que interfieren con las actividades económicas humanas. Las especies de mayor importancia en la Argentina son: *A. aegypti* y *A. albopictus* como vectores de arbovirosis, *Anopheles darlingi* Root y *A. pseudopunctipennis* Theobald vectores de paludismo, *Culex pipiens* Linné, vector de arbovirus y *D. immitis* y *Ochlerotatus albifasciatus* (Macquart) vector de arbovirus e importante plaga en la Argentina. Este número se incrementará sensiblemente cuando se amplíen los estudios sobre la identidad de los vectores de arbovirus en la Argentina, así como cuando se investiguen otras especies de *Anopheles* respecto de su capacidad vectorial de los agentes etiológicos del Paludismo.

Las áreas palúdicas actuales en la Argentina se encuentran reducidas a focos en las provincias de Salta, Jujuy y Misiones. El número de enfermos de paludismo supera anualmente los 400. Las principales especies transmisoras del agente causal del paludismo en la Argentina son: *A. darlingi* en la región del noreste y *A. pseudopuntipennis*, en la región del noroeste (Zaindenberg, 2002).

La re-emergencia del dengue en la Argentina es reciente, registrándose casos de dengue clásico desde 1997 en un área que abarca casi las mismas

provincias mencionadas para Paludismo (Avilés *et al.*, 1999). Varias decenas de enfermos de dengue clásico se han detectado en partidos del denominado conurbano bonaerense, aunque ninguno correspondió a casos autóctonos. El culicido *A. aegypti* es el principal vector de dengue en América y se encuentra actualmente distribuido en 16 provincias argentinas, siendo su límite sur las provincias de Buenos Aires y La Pampa (Curto *et al.*, 2002). La detección reciente de *A. albopictus* en la Argentina (Rossi *et al.*, 1999), otro vector importante de dengue y otras arbovirosis, complica aun más la situación sanitaria de la Argentina y el resto de América. Esta especie tolera condiciones ambientales más extremas que *A. aegypti*, característica que le permitiría una distribución mucho más amplia.

La información sobre virus de encefalitis y sus vectores es escasa en la Argentina. Desde 1908 se han registrado importantes epizootias de Encefalitis Equina que han afectado principalmente la provincia de la Pampa. Durante los años 1982-1983 se registró una epizootia de Encefalitis Equina del Oeste cuyo epicentro se localizó en la provincia de Santa Fe y se extendió hasta la provincia de Río Negro. Si bien la aparición de casos humanos fue rara, las pérdidas económicas fueron importantes (Sabattini *et al.*, 1985). En el año 2002, después de 17 años de ausencia en el territorio argentino, se registró un caso de encefalitis de San Luis en la ciudad de Córdoba (Spinsanti *et al.*, 2003).

La filariasis en humanos y animales domésticos y la identificación de los culicidos vectores han sido muy poco investigados. La prevalencia de la filariasis canina varió entre 4 y 74%, en estudios realizados en las provincias de Chaco, Formosa, Corrientes y Buenos Aires (Lighthowler *et al.*, 1992; Meyer & Milanta, 1997). Por otra parte se han registrado casos de dirofilariasis immitis pulmonar en humanos en las provincias de Buenos Aires y Corrientes (Barcat *et al.*, 1999; Caballer *et al.*, 1994).

La información existente en la Argentina sobre los inconvenientes y pérdidas económicas ocasionadas por algunas especies de culicidos en áreas agrícola-ganaderas y turísticas es escasa y en general, no cuantificada. El culicido de las inundaciones, *O. albifasciatus*, cuya distribución abarca casi todo

el territorio argentino, suele alcanzar niveles poblacionales elevados en primavera y otoño, atacando con voracidad a animales y al hombre. Amplias áreas urbanas y rurales de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, La Pampa, Mendoza, Río Negro y Santa Fe sufren anualmente las consecuencias de la proliferación de *O. albifasciatus*, provocando la muerte de terneros en zonas de cría, pérdidas en la producción de carne y leche, encarecimiento de la recolección de frutas y hortalizas e imposibilidad del uso de áreas de recreación durante los períodos de elevadas densidades de adultos (Prosen *et al.*, 1960; Raña *et al.*, 1971; Hack *et al.*, 1978; Gleisser *et al.*, 1997).

La OMS estima que la mitad de la población mundial, más de 3000 millones de personas, viven en áreas de riesgo de contraer enfermedades transmitidas por culícidos (OMS, 2004). Esta situación justifica la necesidad de conocer más profundamente la biología, ecología y taxonomía de los culícidos y obliga a los gobiernos a tomar medidas de prevención y a desarrollar estrategias de control que intenten interrumpir la transmisión de las enfermedades y reducir la densidad de culícidos a niveles que no afecten la calidad de vida de los habitantes.

3. Control de culícidos

Las estrategias de control de culícidos incluyen tratamientos para disminuir o eliminar tanto los estadios larvales como los adultos. Entre las medidas de prevención contra los adultos podemos mencionar: la protección personal (repelentes en piel y ropa, tules alrededor de las camas, etc.), el uso de telas mosquiteros y la aplicación terrestre o aérea de insecticidas químicos (McClelland, 1984).

Respecto al control de las larvas de culícidos se han utilizado métodos culturales como la reducción o eliminación de los sitios de cría, secando, inundando o eliminando los ambientes, métodos químicos (aceites, organofosforados, organoclorados, piretroides, factores análogos a la hormona de juvenil, etc.), y el control biológico (depredadores, parásitos y patógenos).

Si bien el uso de insecticidas químicos ha sido la elección más efectiva y universalmente elegida para el control de culícidos, la aplicación prolongada de dosis crecientes de estos productos han provocado niveles elevados de contaminación del ambiente, peligrosos para los animales y el hombre. Por otra parte las poblaciones de los insectos vectores tratados, no fueron totalmente erradicadas, retornando y desarrollando resistencia a muchos insecticidas (Georghiou & Saito, 1983). El creciente interés en la calidad del ambiente ha intensificado en los últimos años la búsqueda de nuevas herramientas para controlar insectos de importancia sanitaria que sean más seguros para la fauna y compatibles con el ambiente (Weiser, 1991; Tanada & Kaya, 1993; Lacey, 1997).

4. Enemigos naturales de culícidos

El control biológico es el estudio y utilización de enemigos naturales (depredadores, patógenos y parásitos) para controlar una especie perjudicial, en nuestro caso las especies de culícidos de importancia sanitaria. La bibliografía mundial sobre los enemigos naturales de culícidos es abundante, habiéndose descrito numerosos virus, bacterias, hongos, protozoos, nemátodos y depredadores de estadios inmaduros y adultos de culícidos (Jenkins, 1964; Robert & Strand, 1977; Roberts & Castillo, 1980; Roberts *et al.*, 1983; Weiser, 1991).

Entre los depredadores de culícidos se han citado, hemípteros, coleópteros, odonatos, turbelarios y peces. Los peces han sido los más estudiados y evaluados, siendo el pez larvívoro, *Gambusia affinis* la especie más utilizada en el mundo como regulador de los estadios inmaduros de culícidos (Hoy & Reed, 1971; David & Meish, 1977; Bay, 1985; Meisch, 1985).

Un espectro amplio de patógenos y parásitos (virus, bacterias, hongos, protozoos y nemátodos) han sido estudiados y evaluados como potenciales agentes de control biológico de culícidos (Chapman, 1985).

Entre los virus patógenos de culícidos se han registrado baculovirus (Nucleopoliedrovirus), Reovirus (Cypovirus), Entomopoxvirus, Chloriridovirus (RMIV y TMIV), Densovirus y pequeños virus ARN semejantes a Picornavirus (Anderson, 1970; Hall & Fish, 1974, Fukuda & Clark, 1975; Adams, 1991; Schuler *et al.*, 1995; Lacey, 1997; Hunter-Fujita *et al.*, 1998).

Las bacterias entomopatógenas no son frecuentes en poblaciones naturales de culícidos, aunque algunas bacterias del suelo son altamente patogénicas para larvas de culícidos. Tal es el caso de *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis* (Bti) y *Bacillus sphaericus* (Bs), las cuales forman cristales proteicos con alto poder larvicida, en un amplio espectro de culícidos susceptibles (Lacey & Lacey, 1981; Lacey & Singer, 1982; McLaughlin & Billodeaux, 1983; Thiery & Frachon, 1997; Skovmand *et al.*, 1998; Follet & Duan, 2000). Los productos insecticidas con base en toxinas de Bti y Bs han llegado al mercado en diferentes formulaciones siendo uno de los pocos productos biológicos comerciales empleados en el control de culícidos (Lacey & Kaya, 2000).

Los hongos constituyen otro importante grupo de patógenos de culícidos. Entre los más importantes se pueden citar *Culicinomyces clavisporus* (Sweeney *et al.*, 1983, Sweeney, 1986; García & Sweeney, 1986), *Lagenidium giganteum* (Jaronski & Axtell, 1982; Kerwin & Washino, 1986; 1988; Guzman & Axtell, 1987), *Leptolegnia chapmanii* (McInnis *et al.*, 1985; Zattau & McInnis, 1987; Lord *et al.*, 1988) y diferentes especies del género *Coelomomyces* (Roberts, 1970; Federici, 1985; Couch & Bland, 1985). *C. clavisporus* y *L. giganteum* han sido evaluados a campo en criaderos de culícidos con resultados alentadores existiendo en el mercado productos comerciales de *L. giganteum* para el control de larvas de culícidos. (Kerwin & Petersen, 1997).

Entre los protozoos parásitos de culícidos se pueden mencionar ciliados, flagelados, gregarinas, y microsporidios. Ciliados pertenecientes a los géneros *Lambornella* y *Tetrahymena* han sido hallados frecuentemente parasitando larvas de culícidos (Grassmick & Rowley, 1973; Clark, & Brandl, 1976; Corliss & Coats, 1976; Dzerzhinskii & Dubitskii, 1977). La presencia de flagelados en culícidos

no ha sido registrada con frecuencia, siendo las especies más representativas *Crithidia fasciculata* y *Blastocrithidia culicis* (Weiser, 1991). Infecciones por gregarinas son comunes en especies de culícidos que habitan ambientes reducidos naturales o artificiales. Entre las especies de gregarinas más comunes se pueden citar *Ascogregarina barretti*, *A. culicis* y *A. taiwanensis* (Munstermann & Wesson, 1990; Siegel *et al.*, 1992; Garcia *et al.*, 1994b; Reyes-Villanueva *et al.*, 2001). Sin duda, el grupo de protozoos patógeno de culícidos más importante y mejor representado lo constituyen los microsporidios. Varias decenas de especies pertenecientes a 15 géneros han sido descritas en culícidos, la mayoría incluidas en los géneros heterospóricos *Amblyospora* y *Parathelohania* (Sprague, 1977; Becnel & Andreadis, 1999).

Los nemátodos constituyen otro grupo importante de parásitos de culícidos. Todos los nemátodos hallados naturalmente en culícidos, pertenecen a la familia Mermithidae, algunas de cuyas especies han sido extensamente estudiadas, tal es el caso de *Romanomermis culicivora* Ross & Smith, (Petersen, 1985).

5. Situación actual del conocimiento de los parásitos y patógenos de culícidos en la Argentina

Los parásitos y patógenos de culícidos comenzaron a estudiarse en la Argentina a principios de la década del 80. Durante este período se han identificado virus (Nucleopoliedrovirus), bacterias (*Vivrio* sp.), hongos (*Aphanocladium album*, *Coelomomyces* spp., *Leptolegnia chapmanii*, *Smittium* spp.), (García & López Lastra, 1989; López Lastra, 1990, a, b; López Lastra & García, 1997; López Lastra *et al.*, 1991, 1999) gregarinas (*A. culicis*), microsporidios (*Amblyospora* spp., *Hazardia milleri*, *Parathelohania* spp.) (García, 1989; García & Lopez Lastra, 1989; García & Camino, 1990; García & Becnel, 1994) y mermítidos (*Hydromermis* sp. y *Strelkovimermis spiculatus*) (Poinar & Camino, 1986; Camino, 1989; García & Camino, 1990).

La mayoría de estos patógenos han sido identificados a nivel específico. Los ciclos biológicos y las vías de transmisión han sido dilucidadas en varios de los patógenos (Camino & Reboredo, 1994; Micieli *et al.* 2000, 2001). También se determinó la virulencia y patogenicidad y el espectro de especies de culícidos susceptibles a estos patógenos en el laboratorio (Camino & Reboredo, 2000). Estudios epizootiológicos han sido realizados en algunos de estos sistemas hospedador-parásito, principalmente con microsporidios del género *Amblyospora* (Micieli *et al.* 2000; 2001) y el mermítido *S. spiculatus* (Micieli & García, 1999). Hasta el presente, no existe información en la Argentina sobre evaluación de estos parásitos y patógenos en la naturaleza mediante la introducción o incremento de los mismos en poblaciones naturales de culícidos.

6. Nemátodos asociados a insectos

La clasificación de los nemátodos, incluidos los asociados a insectos, es aun inestable al nivel de familia y género. Más de 30 familias de nemátodos están asociadas con insectos, incluyendo los parásitos de plantas (Aphelenchidae) y animales (Filariidae, Onchocercidae, Thelaziidae) que utilizan a los insectos como vectores. Otros tienen una asociación forética (Rhabditidae, Cephalobidae) o son parásitos obligados (Oxyuridae, Thelastomatidae).

Por otro lado existe un grupo de familias parásitas obligadas y facultativas que tienen potencial como agentes de control biológico de insectos, entre ellas Allantonematidae, Heterorhabditidae, Mermithidae, Phaenopsitylenchidae, Sphaerulariidae, Steinernematidae y Tetradonematidae (Kaya & Stock, 1997).

7. Familia Mermithidae

Diagnosis: nemátodos delgados y largos, entre 1 y 10 cm pudiendo llegar a 50 cm de longitud. La cutícula es lisa o presenta fibras entrecruzadas. El

extremo anterior presenta 2, 4 o 6 papilas cefálicas y raramente un par de papilas bucales laterales; anfidios de forma tubular. El esófago está modificado en un tubo delgado rodeado en el extremo posterior por tejido esticosomal en el que cada célula se denomina esticocito. El intestino está modificado en un trofosoma u órgano de almacenamiento de alimento que se transforma en un saco ciego cuando el nemátodo entra al hospedador. Los preparásitos (L2) poseen un estilete funcional y un par de glándulas de penetración que se convierten en rudimentarios luego de penetrar al hospedador. Poseen ovarios pares, vagina musculosa derecha o curvada; los machos con espículas simples fusionadas o pares; gubernáculo y bursa ausente; varias filas de papilas genitales generalmente presentes.

7.1. Mermítidos parásitos de culícidos

Los mermítidos constituyen los únicos nemátodos que se han aislado de la familia Culicidae. Hasta el presente han sido descritas más de 80 especies de mermítidos en culícidos (Petersen, 1985)

Romanomermis culicivorax es el mermítido más estudiado, tanto en condiciones experimentales como naturales. Este nemátodo posee un ciclo típico de los mermítidos acuáticos. Las formas infectantes (L2) maduran y buscan al hospedador activamente. Viven entre 36 a 48 hs, durante el cual deben hallar y penetrar activamente a la larva hospedadora (Petersen, 1975). La fase parásita dentro del hospedador se lleva a cabo entre 7 y 8 días (Gordon *et al.*, 1974). Una vez emergidos del hospedador se entierran en el sustrato, copulan y completan su ciclo aproximadamente en 4 semanas (Petersen, 1985).

Romanomermis culicivorax es altamente específico para mosquitos, aunque otras familias de dípteros pueden ser infectadas. Petersen & Chapman (1979), evaluaron este mermítido en 87 especies de mosquitos y registraron parasitismo en un amplio espectro de hospedadores anophelinos, culicinos y aedinos. Sin embargo cuando el nemátodo fue expuesto a diferentes tipos de invertebrados y vertebrados, solo los primeros estadios de caobóridos, simúlidos y

quironómidos presentaron susceptibilidad al nemátodo (Ignoffo *et al.*, 1973, 1974).

Este nemátodo puede, en bajos porcentajes, pasar al estado adulto del hospedador utilizándolo como una forma de dispersión. En algunos casos completan su desarrollo cuando el hospedador realiza la ingesta sanguínea y emergen cuando estos intentan depositar los huevos. La oviposición, generalmente no se realiza debido a que los parásitos causan una destrucción importante de los órganos reproductores de los culícidos parasitados (Chapman, 1985).

Algunos factores ambientales afectan la viabilidad de las formas infectantes de *R. culicivora* (Petersen & Willis, 1970). A temperaturas entre 21 y 33°C este nemátodo produjo porcentajes de parasitismo superiores que las determinadas a temperaturas entre 12 y 18°C (Brown & Platzer, 1977). Petersen (1975) en un estudio sobre la variación del parasitismo de *R. culicivora* a temperaturas entre 24 y 27°C, encontró que la prevalencia en larvas pertenecientes al género *Culex* declinó rápidamente luego de 24hs siendo casi nulo a las 72hs.

La presencia de ciertos iones en las aguas de los criaderos de culícidos con exceso de materia orgánica, pueden interferir en el parasitismo. Entre los más tóxicos fueron determinados los fosfatos y sulfatos (Brown & Platzer, 1977; Petersen & Chapman, 1979).

Romanomermis culicivora fue producido masivamente en el laboratorio en larvas de *Culex pipiens quinquefasciatus* Say (Petersen & Willis, 1972a). Para una relación de preparásitos por hospedador de 15:1, los autores obtuvieron un valor de prevalencia promedio de 88%. Por otra parte niveles de parasitismo entre 91 y 100% produjeron un promedio de estados postparásitos de 10,9 gramos a partir de 20.000 larvas hospedadoras (Petersen, 1978).

Las aplicaciones a campo como agente de control biológico, mostraron valores de parasitismo entre 65 y 33 % dependiendo de los estadios de los culícidos (Petersen & Willis, 1972b; 1974). Santamarina *et al.* (1996), determinó que el nemátodo fue capaz de parasitar larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* y

Culex quinquefasciatus. Inclusive el nemátodo logró establecerse en criaderos en los que había sido introducido mediante liberaciones de L2 (Petersen & Willis, 1975).

Con el fin de ser llevado al mercado como insecticida ha sido intensamente estudiado (Petersen, 1982; 1985). Sin embargo algunas limitaciones ambientales, el corto período de tiempo en el que son viables los huevos en los cultivos de los nemátodos y la mortalidad ocasionada por su transporte, fueron entre otros, algunos de los obstáculos que impidieron continuar con su comercialización.

La información sobre mermítidos parásitos de culícidos en la región Neotropical es notablemente escasa, limitándose a dos hallazgos en culícidos de la Argentina, *Hydromermis* sp. en larvas de *Psorophora ferox* (Camino, 1989) y *Strelkovimermis spiculatus* descrito en larvas del mosquito de las inundaciones, *O. albifasciatus* (Poinar & Camino, 1986).

7.2. *Strelkovimermis spiculatus*

El mermítido *S. spiculatus* Poinar & Camino, 1986, se halló por primera vez en larvas de *O. albifasciatus*, en el arroyo Miguelín, Punta Lara, partido de la Ensenada, Pcia. Buenos Aires, (Poinar & Camino, 1986) y posteriormente en otros hospedadores culícidos (García & Camino, 1990; García *et al.* 1994a).

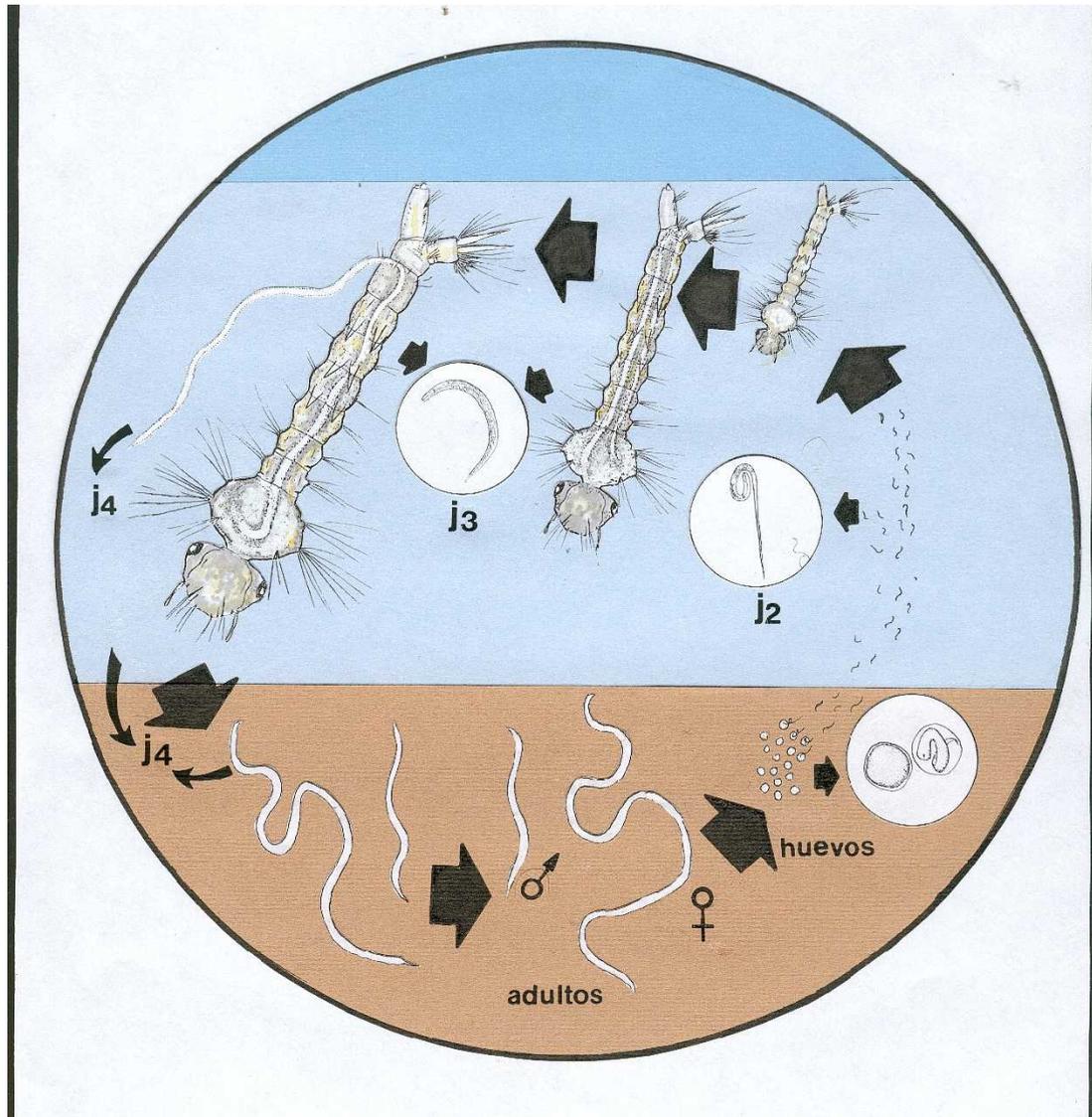
El ciclo biológico tiene una duración aproximada de 35 días dependiendo de la temperatura y es similar al de otros mermítidos acuáticos (Camino & Reborado, 1994). Los adultos colocan los huevos en el ambiente en el que se encuentran. Los huevos son esféricos, lisos, sin biso y transparentes. El desarrollo embriológico tiene lugar luego de la oviposición con una duración aproximada de 8 días, a 20°C de temperatura (Camino & García, 1988). El estado infectante (L2) sale del huevo y busca al hospedador, luego penetra a través de la cutícula utilizando el estilete e ingresa al hemocele. Durante la etapa parasítica, el nemátodo absorbe los nutrientes del hospedador a través de su cutícula y los almacena en el trofosoma. Cuando la fase parasitaria está

finalizada, la L4 denominada estado postparásito (L4), emerge del hospedador y comienza su fase libre. La muerte del hospedador generalmente tiene lugar como consecuencia del trauma causado por la emersión del parásito. Posteriormente, el nemátodo muda al estado adulto, copula y ovipone en el ambiente para completar el ciclo biológico (Fig. 1).

Respecto a las limitaciones ambientales, este mermítido a diferencia de *R. culicivora*, conservó la capacidad de infectar en agua con pH entre 4,5 y 9,5 y salinidad entre 0,0 M y 0,120 M de ClNa (Camino & García , 1991).

Existe información referida a la prevalencia natural, estacionalidad y rango de hospedadores naturales de *S. spiculatus* (García & Camino, 1990; Campos *et al.* 1993; García *et al.* 1994a; Maciá *et al.* 1995; Micieli & Garcia, 1999), sin embargo hasta el momento no se ha estudiado en profundidad, con el objetivo de utilizarlo como agente de control biológico de culícidos en la naturaleza.

Figura 1. Ciclo biológico del nemátodo *Strelkovimermis spiculatus* (J1: preparásito juvenil 1, dentro del huevo; J2 o L2 juvenil : estado preparásito; J3: estado parásito; J4: estado postparásito libre).



OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la potencialidad del nemátodo *S. spiculatus* como biocontrolador de culícidos en condiciones naturales.

Objetivos específicos

A. Perfeccionar la producción del nemátodo *S. spiculatus* en condiciones de laboratorio.

B. Estudiar el efecto que ejercen ciertos factores abióticos y bióticos sobre la capacidad de infectar del nemátodo *S. spiculatus*.

C. Determinar la actividad parasitaria de *S. spiculatus* en criaderos naturales de culícidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Área de estudio

El área de estudio abarcó diferentes ambientes de cría de culícidos situados en los partidos de Berazategui, Berisso, Ensenada y La Plata, Provincia de Buenos Aires.

2. Prospección de *S. spiculatus* en criaderos de culícidos

2.1. Ambientes artificiales

La búsqueda del nemátodo *S. spiculatus* se realizó en poblaciones naturales de los culícidos *A. aegypti* y *C. pipiens* en ambientes artificiales. Los criaderos muestreados estuvieron compuestos por recipientes de distintos materiales (plástico, vidrio, chapa), cuyo aporte de agua provino exclusivamente de las precipitaciones pluviales o por acción humana (Fig. 2).

2.2. Ambientes permanentes

Estos ambientes estuvieron constituidos por zanjas cuyo aporte de agua se origina de los desagües domiciliarios y las precipitaciones pluviales, sitio de cría natural para el culícido *C. pipiens*. Se ubicaron en las localidades de La Granja y Melchor Romero, partido de La Plata (Fig. 3).

2.3. Ambientes temporarios

Las prospecciones en culícidos se llevaron a cabo en un ambiente constituido por una depresión del terreno de 6 m x 3 m de superficie y 0,40 m de profundidad, ubicado en la Selva Maginal de Punta Lara. La inundación de

este sitio de cría de los culícidos *Ochlerotatus crinifer* (Theobald) y *Psorophora ferox* (Von Humboldt) dependió de las precipitaciones y los desbordes de arroyos y canales aledaños, luego de producirse crecidas del nivel del Río de La Plata (Fig. 4).

El otro tipo de ambientes temporarios, estuvo compuesto por sitios de cría del nemátodo *S. spiculatus* y su hospedador natural *O. albifasciatus*, el cual correspondió a depresiones del terreno donde se acumula agua proveniente exclusivamente de las precipitaciones (Fig. 5 A,B,C;D). La búsqueda de los culícidos y del nemátodo, se realizó en una amplia variedad de este tipo de criaderos, ubicados en las localidades de Berisso, La Plata, Ensenada y Berazategui.

Entre los ambientes donde se registró la presencia de *S. spiculatus*, se seleccionaron 3 sitios de cría representativos, que permitieron obtener información sobre su biología en condiciones naturales.

SITIO 1 : Ubicado en el Partido de la Ensenada (34°52'13" S, 57°57'30" O). Este ambiente correspondió a una hondonada de 15 m de largo, 10 m de ancho, y 0,5 m de profundidad.

SITIO 2 : Ubicado en la localidad de Gonnet, Partido de la Plata (34°52'29" S; 58°00'31"O). Correspondió a una depresión de 15 m de largo, 10 m de ancho y 0,4 m de profundidad.

SITIO 3 : Ubicado en el Paseo del Bosque de la ciudad de La Plata (34°54'26" S; 57°56'11" O). Consistió en una hondonada de 50 m de largo, 20 m de ancho, y 0,5 m de profundidad.

Estos ambientes fueron muestreados a las 24-48 hs posteriores a la inundación de los criaderos, a partir de las precipitaciones. Las prospecciones en ambientes artificiales y permanentes se realizaron cada 15 días.

Figura 2. Ambientes artificiales, sitios de cría de culícidos.



Figura 3. A, B. Ambientes permanentes, sitios de cría del culicido *C. pipiens*. C. sitio de cría de larvas de *Anopheles*.



Figura 4. Ambiente temporario, sitio de cría de los culícidos *O. crinifer* y *P. ferox*.



Figura 5.A,B,C,D. Ambientes temporarios, sitios de cría del culicido *Ochlerotatus albifasciatus*.





3. Recolección de culícidos

En cada ambiente se determinó la presencia/ausencia de agua, nivel de inundación y temperatura del agua y la presencia/ausencia de larvas y pupas de culícidos.

Las larvas de los culícidos presentes en los diferentes tipos de criaderos, se recolectaron utilizando un cucharón de 300 ml y se filtraron a través de una red de malla fina. Posteriormente se colocaron en baldes plásticos y se transportaron al laboratorio para su observación.

También se realizó la disección de adultos de *O. albifasciatus* para determinar la presencia del nemátodo en dicho estadio. Los adultos se recolectaron en uno de los sitios de cría ubicados en el partido de Berazategui mediante el uso de aspiradores a batería. Se transportaron al laboratorio en jaulas recubiertas con alambre mosquitero.

4. Detección y procesamiento de los culícidos parasitados

Las larvas examinadas en el laboratorio correspondieron a las siguientes especies: *Anopheles albitarsis* Lynch Arribalzaga, *Culex chidesteri* Dyar, *C. dolosus* Lynch Arribalzaga, *C. maxi* Dyar, *Ochlerotatus albifasciatus* (Macquart), *O. crinifer* (Theobald), *Psorophora ciliata* (Fabricius), *P. cyanescens* (Coquillett), *P. ferox* (Von Humboldt) y *Uranotaenia* sp. Se analizó un número variable de larvas por especie. Los culícidos se identificaron con la clave de Lane (1952) y Darsie & Mitchell (1985). En cada criadero se registró la cantidad de estados preparásitos por mililitro de agua de la muestra. Un porcentaje variable de larvas de culícidos (aproximadamente el 10%) se observó bajo microscopio estereoscópico y óptico para determinar la presencia del nemátodo. El resto de las larvas se colocaron en bandejas plásticas de 38 x 28 cm con 1000 ml de agua del criadero y se dejaron crecer hasta estadio IV (Fig. 6). Posteriormente los culícidos se colocaron individualmente en placas de cultivo de 24 celdas con 3 ml de agua

por celda, hasta la emersión de los nemátodos postparásitos, donde se determinó el porcentaje de larvas parasitadas (prevalencia) y el número de nemátodos por larva (intensidad) para cada especie. La utilización del agua del criadero para la cría de las larvas hasta el estadio IV, puede producir valores sobrestimados del porcentaje de parasitismo a causa de infecciones posteriores a la captura de las larvas. En un estudio previo, Micieli y García (1999) encontraron formas infectantes de *S. spiculatus* durante 7 días en condiciones naturales.

5. Instalación y mantenimiento de las colonias del nemátodo y culícidos en el laboratorio

5.1. Cría de los culícidos

El culícido *O. albifasciatus* constituye el primer hospedador natural del nemátodo descrito y el único en el cual *S. spiculatus* provoca epizootias. Sin embargo hasta el momento no ha podido ser colonizado en el laboratorio, debido a que realiza enjambres a varios metros de altura para llevar a cabo la cópula. Por tal motivo, para el mantenimiento del nemátodo en el laboratorio se utilizaron los culícidos *A. aegypti* y *C. pipiens* como hospedadores. Las colonias de los culícidos se mantuvieron en el CEPAVE, Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (U.N.L.P-C.O.N.I.C.E.T). Los estadios larvales para la instalación de las colonias en el laboratorio se recolectaron en el campo, según la metodología descrita anteriormente para la recolección de los culícidos.

5.1.1. *Aedes aegypti*

Las larvas recolectadas en el campo, se colocaron en bandejas plásticas de 38 x 28 cm y se alimentaron con alimento para cobayos finamente molido (Fig. 6). Las pupas se transportaron a jaulas de 50 x 50 x 50 cm para la emersión

de los adultos (Fig. 7). Se les proporcionó pasas de uva como fuente de hidratos de carbono. Para la oviposición, se colocó en las jaulas un recipiente plástico con una tira de papel rodeando el perímetro interno del recipiente y agua hasta la mitad del papel, sin sumergirlo totalmente. Semanalmente se introdujo un pollo como fuente de sangre para la obtención de huevos. A las 48 hs se retiró el papel con los huevos y se mantuvieron en bolsas de polietileno hasta su eclosión. Para la obtención de larvas los papeles con los huevos se sumergieron en las bandejas plásticas con agua declorinada. Las colonias se mantuvieron a temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 1$, fotoperíodo de 12:12 (L / O) y 85% de humedad relativa.

5.1.2. *Culex pipiens*

Para las colonias de *C. pipiens* se procedió de manera similar que para *A. aegypti*. Sin embargo debido a que este culícido coloca sus huevos sobre la superficie del agua en forma agrupada (balsas) (Fig. 8), se colocó un recipiente plástico con agua, sin el agregado de papel, para la obtención de los huevos. Por ser una especie de hábitos nocturnos la ingesta sanguínea se realizó en oscuridad.

5.2. Cría de *S. spiculatus*

El mantenimiento del nemátodo en condiciones de laboratorio se realizó siguiendo la metodología descrita por Camino & Reboredo (1996). Las L4 (postparásitos) emergidos de larvas de culícidos naturalmente infectados, recolectados en el campo, se colocaron en recipientes de cría de 10 x 15cm, con arena esterilizada (2 cm de espesor) y agua declorinada (3 cm de profundidad) (Fig. 9). Cuando los nemátodos se internaron en el sustrato se eliminó el exceso de agua. Los recipientes de cría se cubrieron y conservaron en la oscuridad, por un período mínimo de 5 semanas. Durante este período los nemátodos maduraron sexualmente, copularon y las hembras depositaron los huevos en el

sustrato. El desarrollo embrionario tuvo lugar durante ese tiempo. Transcurrido ese período mínimo, las bandejas se inundaron con agua de clorinada y en las 12 hs siguientes se produjo la eclosión de los estadios infectantes del nemátodo (L2 o preparásitos). Posteriormente el agua con las formas infectantes se colocó en una probeta graduada, se homogeneizó por agitación y se realizaron diluciones volumétricas que facilitaron la cuantificación de los nemátodos. Se determinó al microscopio estereoscópico el número de preparásitos en 10 alícuotas de 1 ml de la suspensión más diluida. Las L2 del nemátodo se expusieron a las larvas de estadio II de *A.aegypti* (entre 500 a 1000 larvas) en la relación 10:1 L2/hospedador, dosis que asegura 90 a 100% de parasitismo. Los nemátodos se desarrollaron en las larvas de culícidos durante 5 a 7 días (Fig. 10). Las infecciones se realizaron en recipientes plásticos de 21 cm de diámetro con 1000 ml de agua de clorinada durante 24 hs. Para detener la infección, se eliminaron los preparásitos del nemátodo, haciendo pasar el agua de los recipientes por una red que retuvo las larvas y permitió el paso de las L2. Las larvas del culícido se separaron para su desarrollo en bandejas plásticas de 38 x 28 cm, con 1,5 litros de agua de clorinada y alimento. Cuando las larvas llegaron a estadio IV, se colocaron para la emersión de los postparásitos, sobre un tamiz superpuesto a una bandeja de 30 cm de largo x 17 cm de ancho x 8 cm de profundidad, que retuvo las larvas de culícidos y permitió el paso de los nemátodos (Fig. 11). Los L4 del nemátodo se depositaron sobre el fondo de la bandeja y se recolectaron con una aguja de disección doblada en L. Posteriormente se determinó el peso de los nemátodos obtenidos en cada infección en una balanza digital y se transportaron a los recipientes de cría para completar su desarrollo. Una vez que los nemátodos postparásitos se enterraron en los cultivos, se eliminó el exceso de agua. Los cultivos se taparon, se colocaron en bolsas plásticas para conservar la humedad y se almacenaron hasta ser inundados para la obtención de las formas infectantes de *S. spiculatus*.

Las colonias del nemátodo, se mantuvieron a temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 1$ y 85% de humedad relativa.

Figura 6. Bandeja de cría de los estadios larvales de los culícidos *Aedes aegypti* y *Culex pipiens* para el mantenimiento de *Strelkovimermis spiculatus* en el laboratorio.



Figura 7. Jaulas para el mantenimiento de los adultos de los culícidos *Aedes aegypti* y *Culex pipiens* para la cría de *Strelkovimermis spiculatus* en el laboratorio.

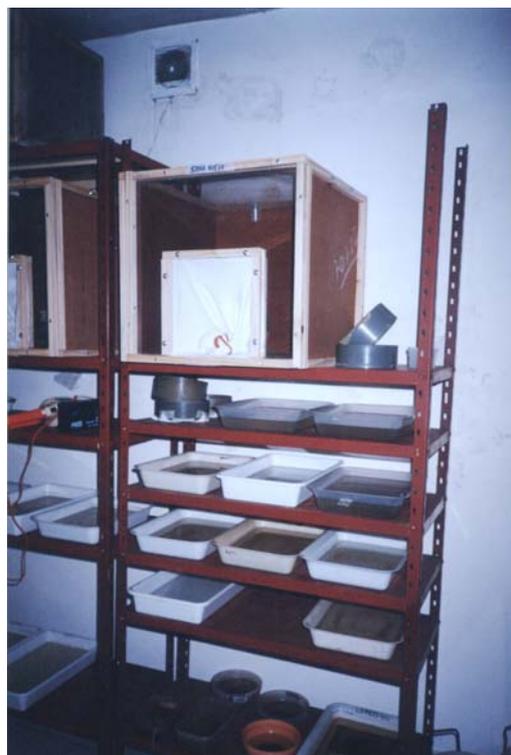


Figura 8. Recipientes para la puesta de las balsas del culícido *Culex pipiens* (ver flecha).

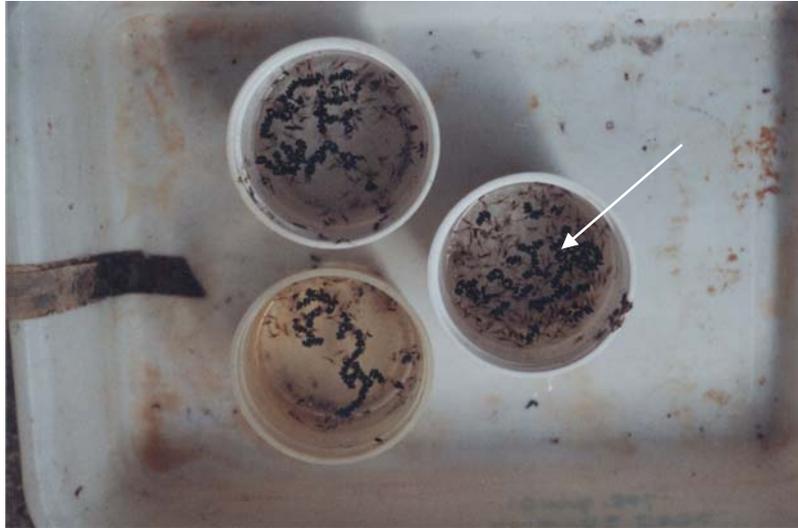


Figura 9. A, B, C. Recipientes de cría del nemátodo *Strelkoviimermis spiculatus*.



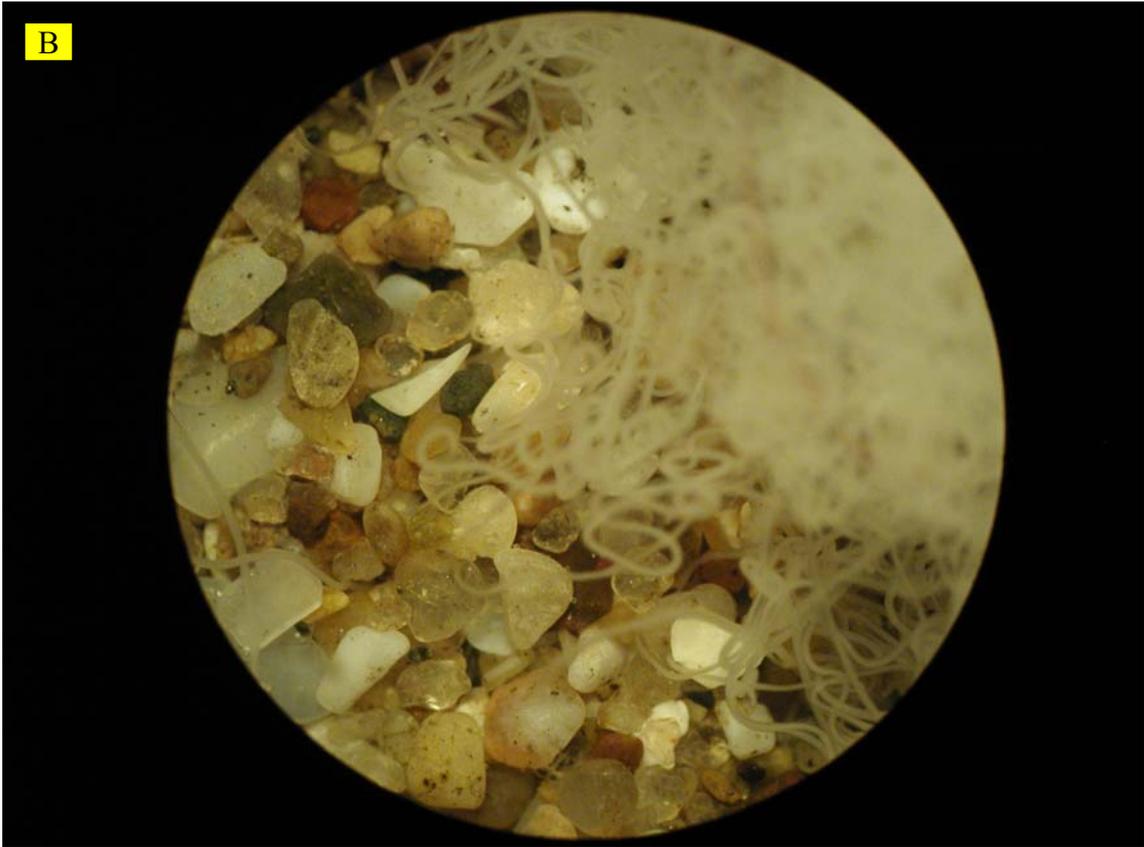


Figura 10. Larva de estadio IV de *Aedes aegypti* parasitada por el nemátodo *Strelkovimermis spiculatus* (Microscopio estereoscópico 10x)



Figura 11. Bandeja para la emersión de los estados postparásitos del nemátodo *Strelkovimermis spiculatus*.



6. Utilización de *A. aegypti* y *C. pipiens* como hospedadores del nemátodo *S. spiculatus*

6.1. Efecto de la variación del número de estados preparásitos de *S. spiculatus* sobre la prevalencia en las larvas de *A. aegypti* y *C. pipiens*

Para determinar una dosis de nemátodos por hospedador adecuada para la cría masiva de *S. spiculatus* en el laboratorio, se expusieron separadas por especie, 50 larvas de estadio II de los culícidos *A. aegypti* y *C. pipiens*, a una relación de preparásitos por hospedador de 3:1; 5:1; 8:1 y 10:1. Las infecciones se realizaron en recipientes plásticos de 8 cm de diámetro y 100 ml de agua declorinada, durante 24 hs. Posteriormente se eliminaron las formas infectantes y las larvas de culícidos se retornaron a los recipientes para su desarrollo.

Cuando llegaron a estadio IV se separaron para determinar el porcentaje de infección y el número de nemátodos por larva para cada dosis y especie. Se estimó el porcentaje de estados preparásitos del nemátodo que lograron penetrar, desarrollarse y emerger como estados postparásitos (eficiencia). Se realizaron 3 repeticiones con 3 réplicas para cada dosis y especie.

6.2. Susceptibilidad de los estadios larvales de *A. aegypti* y *C. pipiens* al nemátodo *S. spiculatus*

Para conocer la susceptibilidad al nemátodo de los diferentes estadios larvales de los culícidos utilizados como hospedadores, *A. aegypti* y *C. pipiens*, se expusieron 50 larvas de estadio I, II, III y IV de cada especie, a una relación de 10:1 preparásitos por hospedador. Las larvas se colocaron separadas por especie y por estadio en recipientes plásticos de 8 cm de diámetro con 100 ml de agua declorinada. Se realizaron 3 repeticiones con 3 réplicas para cada estadio.

A las 24 hs de exposición se eliminaron las formas infectantes. Cuando las larvas de culícidos liberaron los estados postparásitos, se determinó la prevalencia e intensidad para cada especie y estadio.

7. Producción masiva de estados postparásitos (L4) de *S. spiculatus*

Con el fin de incrementar la producción de estados postparásitos de *S. spiculatus* en el laboratorio, las infecciones con el nemátodo se realizaron exponiendo un número más elevado de larvas de culícidos ($n=10.000$) que el utilizado normalmente para el mantenimiento de las colonias de este parásito. La producción masiva se realizó basándose en la metodología descrita por Camino & Reboredo (1996), para el mantenimiento de *S. spiculatus*.

Para determinar una relación de formas infectantes (L2) por cada larva de culícido expuesta, que permita obtener la mayor eficiencia (n° postparásitos obtenidos/ n° preparásitos utilizados en las infecciones), las larvas de estadio II de *A. aegypti* se expusieron al nemátodo con dosis de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 7:1 y 10:1 preparásitos por hospedador. Las infecciones se realizaron en recipientes plásticos de 21cm de diámetro con 1000 ml de agua declorinada. A las 24hs se eliminaron las formas infectantes del nemátodo y las larvas de *A. aegypti* se transportaron a bandejas de 58 x 67 cm con 10 litros de agua declorinada para su desarrollo (Fig. 12). Se les suministró alimento y oxigenación por medio de un aireador eléctrico para evitar la excesiva proliferación de bacterias. Los culícidos se mantuvieron en las bandejas hasta llegar a estadio IV donde se transportaron a las bandejas acondicionadas para la emersión de los juveniles postparásitos. La producción de los postparásitos se estimó en gramos y se registró el número de nemátodos por cada gramo. Posteriormente se colocó en cada bandeja de cría 1 gramo de estados postparásitos. El porcentaje de parasitismo, intensidad y relación de sexos se determinó para cada dosis utilizada.

Figura 12. Bandejas utilizadas para la producción masiva del nemátodo *Strelkovimermis spiculatus*.



8. Producción de estados preparásitos (L2) en los cultivos de *S. spiculatus*

8.1. Producción de estados preparásitos de *S. spiculatus* en cultivos inundados semanalmente

Los cultivos de *S. spiculatus* se inundaron una vez transcurridas 5 semanas de almacenamiento, con el objetivo de determinar el número de formas infectantes producidas. Los recipientes de cría se inundaron con 100 ml de agua de clorinada durante 12 hs y se determinó la producción de estados preparásitos por dilución volumétrica, en una alícuota de 10 ml. Para determinar la producción total de formas infectantes en los cultivos, se eliminó el exceso de agua de los cultivos y se almacenaron nuevamente durante una semana, donde se volvieron a inundar para estimar el número de L2 producidas. Este procedimiento se repitió hasta no registrarse eclosión de L2. Se utilizaron 3 cultivos con cada relación de sexos (♀/♂) de 1 : 1; 1 : 1,5 y 2:1. Posteriormente para evaluar la capacidad infectiva de los estados preparásitos a través de las sucesivas inundaciones, se expusieron 50 larvas de estadio II de *A.aegypti* con las L2 provenientes de cada inundación, en una relación de 10:1 preparásitos por hospedador. Las infecciones se realizaron en recipientes plásticos de 8 cm de diámetro con 100 ml de agua de clorinada durante 24 hs. Cuando el número de preparásitos obtenido en cada inundación fue menor a la dosis utilizada para exponer 50 larvas de culícidos (500 preparásitos), se agregó un número de larvas que mantenga la relación de 10:1 L2/hospedador, ajustando el volumen de agua para mantener la densidad de juveniles preparásitos y hospedador por mililitro. Se determinó la prevalencia e intensidad de infección cuando las larvas de *A. aegypti* llegaron a estadio IV. Se realizaron 3 réplicas para las infecciones en cada semana de inundación. Cuando el número de L2 del nemátodo que eclosionaron fue inferior al necesario para realizar las 3 réplicas se realizó una sola infección.

8.2. Producción de estados preparásitos de *S. spiculatus* en cultivos inundados permanentemente

Se estudió la viabilidad y el número de formas infectantes producidas en cultivos que permanecieron con agua desde que se colocaron los postparásitos en los recipientes de cría para completar su desarrollo, hasta la eclosión de las formas infectantes. Se utilizaron cultivos con una relación de sexos de 2 ♀:1 ♂ y 1 ♀: 2♂. Esta experiencia se realizó con el objetivo de simular un ambiente permanente de cría de culícidos. Una vez que los L4 cumplieron una semana de enterrados, se estimó el número total de formas preparásitas que eclosionaron en cada cultivo en una alícuota de 10 ml. Posteriormente el agua de los recipientes de cría se eliminó y los cultivos se inundaron nuevamente hasta la siguiente semana donde se cuantificaron las L2 eclosionadas. Este procedimiento se repitió semanalmente hasta no registrarse eclosión de formas infectantes.

Para determinar la infectividad de las formas preparásitas en cultivos sometidos a inundaciones permanentes, se expusieron 50 larvas de estadio II de *A.aegypti* a las L2 del nemátodo obtenidas en cada inundación, con una relación de 10:1 preparásitos por hospedador. Las infecciones se realizaron en recipientes plásticos de 8 cm de diámetro y 100 ml de agua de clorinada. Cuando el número de preparásitos fue menor a la dosis utilizada para exponer 50 larvas de culícidos, solamente se agregaron las larvas necesarias para mantener una relación de 10:1 L2/hopedor. La prevalencia e intensidad de infección se determinó cuando las larvas de *A. aegypti* llegaron a estadio IV. Se realizaron 3 repeticiones con 3 réplicas para las infecciones en cada inundación.

9. Efecto de la variación del tiempo de conservación de los cultivos de *S. spiculatus* en la producción e infectividad de estados preparásitos

Los cultivos del nemátodo *S. spiculatus* se almacenaron durante 5, 10, 15 y 20 semanas. Transcurrido ese período de tiempo se inundaron con 100 ml de

agua declorinada durante 12 hs y se determinó el número de formas infectantes producidas para cada tiempo, por dilución volumétrica en una alícuota de 10 ml. Se utilizaron cultivos con una relación de sexos (♀/♂) de 1:1; 1:1,5; 2:1 y 1:2.

Para determinar si el tiempo de conservación de los cultivos afecta la capacidad de infectar de las formas preparásitas del nemátodo, se expusieron 50 larvas de estadio II de *A. aegypti* en una relación de 10:1 L2/hopedor. Las infecciones se llevaron a cabo en recipientes plásticos de 8 cm de diámetro con 100 ml de agua declorinada. Se determinó la prevalencia e intensidad de la infección cuando las larvas de los culícidos llegaron a estadio IV. Se realizaron 3 repeticiones con 3 réplicas para cada experiencia.

10. Longevidad de las formas adultas de *S. spiculatus*

Para determinar la longevidad de las formas adultas del nemátodo *S. spiculatus*, se colocaron 20 individuos con una relación de sexos de 1:1 en recipientes plásticos de 4 cm de diámetro y 20 ml de agua declorinada. Semanalmente se determinó el número de nemátodos sobrevivientes en los recipientes.

11. Evaluación de ciertos factores que pueden afectar la viabilidad e infectividad de los estados preparásitos de *S. spiculatus*

11.1. Presencia de agentes patógenos en cultivos de *S. spiculatus*

Debido a que los adultos de *S. spiculatus* se observaron infectados en los cultivos con hongos pertenecientes a dos géneros diferentes, se llevó a cabo la determinación de estos patógenos. El grado de infectividad ocasionado en los adultos del nemátodo se determinó solo en una de las especies, la cual pudo ser aislada y mantenida en el laboratorio en medio artificial YPSS Emerson. Para determinar el porcentaje de infección, 50 juveniles postparásitos se expusieron en cápsulas de petri de a 6 cm de diámetro con 10 ml de agua destilada, a una

suspensión de 2×10^3 zoosporas/ml y se determinó el parasitismo a las 24, 48 y 72 hs. Se realizaron 3 réplicas para las infecciones.

11.2. Efecto de la temperatura y el tiempo, sobre la supervivencia, longevidad e infectividad de los estados preparásitos del nemátodo

La longevidad de los preparásitos se investigó durante 40 días a cuatro temperaturas, 4, 10, 20 y 27°C. Inicialmente se colocaron tres recipientes plásticos de 250 ml para cada día y temperatura, en total se colocaron 480 recipientes. El día cero, se agregaron 100ml de agua sin cloro y 300 preparásitos (12 hs de emergidos) en cada uno de los 480 recipientes. A intervalos de 24hs se retiraron 3 recipientes de cada temperatura, se dejaron 30 minutos a temperatura ambiente y se cuantificaron los preparásitos móviles en diez alícuotas de 1ml. Con el objetivo de determinar la capacidad infectiva de las L2 a través del tiempo y para cada temperatura, se incorporaron a los recipientes para cada día, larvas de estadio II de *A. aegypti* en una relación de 10:1 L2/hospedador. Cuando el número de nemátodos fue menor a 10, se agregó una larva de *A. aegypti* por recipiente. Luego de 24 hs en contacto, se eliminaron los preparásitos y las larvas se dejaron crecer hasta estadio IV donde se determinó el porcentaje de parasitismo y la intensidad para cada día y temperatura.

11.3. Efecto de la calidad del agua de los criaderos de los culícidos sobre la supervivencia e infectividad de los estados preparásitos de *S. spiculatus*

La infectividad de las L2 del nemátodo se evaluó en 4 tipos diferentes de agua:

MUESTRA 1 : agua corriente (la cual se utilizó como control).

MUESTRA 2: agua proveniente de una zanja de desagüe pluvio-domiciliario, ubicada en la localidad de La Granja, sitio de cría del culícido *C. pipiens* (Fig. 3 A, B).

MUESTRA 3: agua proveniente de depresiones del terreno inundados por incrementos de nivel del Río de La Plata, localizado en la Selva marginal de Punta Lara, sitio de cría de los culícidos *O. crinifer* y *P. ferox* (Fig. 4).

MUESTRA 4: agua proveniente de las precipitaciones en un sitio de cría del hospedador *O. albifasciatus*, ubicado en la localidad de Melchor Romero (Fig. 5).

Las larvas de estadio II de *A. aegypti* (n=50) se expusieron al nemátodo durante 24 hs con una dosis de 10 preparásitos por hospedador. Las experiencias se realizaron en recipientes plásticos de 8 cm de diámetro y 200 ml de capacidad, con 100 ml de cada uno de los 4 tipos de agua. Se determinó la prevalencia e intensidad de infección cuando las larvas de culícidos llegaron a estadio IV. Cuando se observó variación en los valores de parasitismo en una clase de agua determinada respecto del control en agua declorinada, se realizaron infecciones con un gradiente de agua entre 0 y 100%, para determinar si existe algún efecto de este factor sobre la prevalencia del nemátodo. En este caso se utilizaron larvas de los culícidos *A. aegypti* y *C. pipiens* separadas por especie. Por otra parte se expusieron larvas de los culícidos a dosis de 5, 10 y 20 preparásitos por hospedador para evaluar si existe un incremento en los valores de prevalencia. Las infecciones se realizaron siguiendo la metodología mencionada anteriormente. Se determinó la prevalencia e intensidad de infección para cada gradiente de agua y para cada dosis cuando las larvas llegaron a estadio IV. Se realizaron 3 repeticiones con 3 réplicas para cada experiencia.

En los casos en los que se determinó variación en los porcentajes de infección, se evaluó el efecto de la calidad del agua, sobre la viabilidad de las formas infectantes. Se colocaron 100 estados preparásitos de *S. spiculatus* en 3

recipientes plásticos de 8 cm de diámetro y 200 ml de capacidad con 100 ml de agua proveniente del criadero a evaluar. Se determinó el porcentaje de L2 vivas en 1ml, al transcurrir 4 y 24 hs de exposición.

Posteriormente se realizó el análisis químico de las 4 clases de agua utilizadas. Las muestras de agua se colectaron con un cucharón de 300 ml de capacidad, en recipientes de vidrio de 500 ml. Se mantuvieron refrigeradas hasta ser transportadas al Instituto de Limnología de La Plata, Dr. Raúl Ringuelet dependiente de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, U.N.L.P, donde se realizaron los análisis. Para determinar el parasitismo en cada muestra de agua, se expusieron al nemátodo en el laboratorio 50 larvas de estadio II de *A.aegypti* en una relación de 10:1 L2/hopedor. Las infecciones se realizaron en recipientes plásticos de 4 cm de diámetro, con un volumen de 25 ml de agua.

11.4. Efecto de la acción depredadora de copépodos sobre los estados preparásitos de *S. spiculatus*

Los ambientes temporarios en los que se desarrolla el sistema *S. spiculatus* - *O. albifasciatus* en la provincia de Buenos Aires se caracterizan por presentar una limitada riqueza de depredadores. Dentro del reducido número de especies presentes en estos ambientes, los copépodos cyclopoideos que toleran la desecación del ambiente están bien representados. Esta característica del ambiente condujo a evaluar la capacidad depredadora de las especies de copépodos presentes, sobre los estados preparásitos de *S. spiculatus*. Los copépodos utilizados en las experiencias se recolectaron en cuerpos de agua temporarios ubicados en los alrededores de La Plata, Argentina. Se colocaron en bandejas de 40 x 30 x 5 cm con 2.000 ml de agua declorinada y se alimentaron diariamente con una suspensión de algas, bacterias y protozoos. Los ejemplares se mantuvieron a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, un fotoperíodo de 12:12 h (L:O). Los copépodos se identificaron taxonómicamente utilizando las claves de Ringuelet (1953) y Reid (1985).

La evaluación de la acción depredadora de las especies de copépodos más comunes en los criaderos de *O. albifasciatus*, sobre las L2 del nemátodo se

llevó a cabo mediante la realización de dos experiencias. En primer lugar, se colocaron 10 preparásitos de *S. spiculatus* con un adulto de cada una de las especies de copépodos evaluadas. Se utilizaron para las experiencias: *Acantocyclops robustus* (Sars, 1863), *Macrocyclops albidus* (Jurine, 1820) *Mesocyclops annulatus* (Wierzejski, 1892), *Mesocyclops meridianus* (Kiefer, 1926), *Mesocyclops longisetus* (Thiébaud, 1914), *Microcyclops* sp. Claus, 1893, *Thermocyclops* sp. (Kiefer, 1927) y *Tropocyclops* sp. (Kiefer, 1927) (Cyclopoidea) y *Argyrodiaptomus bergi* (Richard, 1897) (Calanoidea). Los copépodos y los estados preparásitos del nemátodo, se colocaron en recipientes con 5 ml de agua declorinada. Las L2 sobrevivientes se cuantificaron a las 24 hs.

Posteriormente se profundizó el conocimiento de la actividad depredadora de *M. annulatus*, debido a que este copépodo es el más abundante y de aparición temprana luego de la inundación de los ambientes naturales del nemátodo *S. spiculatus*. Por tal motivo se colocaron 10 estados preparásitos con un ejemplar de *M. annulatus* en cada estado de desarrollo, en recipientes con 5 ml de agua declorinada. Se utilizaron copépodos juveniles y adultos (machos y hembras). A las 24 hs se cuantificaron los nemátodos sobrevivientes. Para determinar el número de L2 del nemátodo depredados por *M. annulatus*, se colocó un número variable de preparásitos (10, 15, 20, 30, 50, 100, 200 y 300) con un adulto de *M. annulatus*, en recipientes plásticos con 5 ml de agua declorinada. A las 24 hs de exposición, se determinó el número de preparásitos que permanecieron vivos. Posteriormente para conocer el efecto de la densidad de este copépodo sobre los porcentajes de infección por *S. spiculatus*, se expusieron 50 larvas de estadio II de *A. aegypti* con 500 preparásitos del nemátodo y una densidad variable de adultos de *M. annulatus* (0, 5, 10 y 50). Las experiencias se realizaron en recipientes con 1.000 ml de agua declorinada. El porcentaje de parasitismo y la intensidad parasitaria para las 4 densidades de copépodos utilizadas se determinó cuando las larvas de *A. aegypti* llegaron a estadio IV. Se realizaron 3 repeticiones con 3 réplicas para cada experiencia.

12. Espectro de hospedadores culícidos y no culícidos susceptibles a infecciones por *S. spiculatus* en el laboratorio

12.1. Susceptibilidad de hospedadores culícidos a *S. spiculatus* en el laboratorio

Para conocer la susceptibilidad al nemátodo *S. spiculatus* en el laboratorio, se utilizaron larvas de los culícidos *A. aegypti*, *A. albitalarsis*, *Culex apicinus* (Philippi), *C. castroi* Casal & García, *C. chidesteri*, *C. dolosus*, *C. maxi*, *C. pipiens*, *C. renatoi* Lane & Ramalho, *Isostomyia paranensis* (Brethes), *O. albifasciatus*, *O. crinifer*, *Psorophora ciliata*, *P. cyanescens*, y *P. ferox*. Los culícidos se expusieron al nemátodo separados por estadio y por especie a una dosis de 10:1 preparásitos por hospedador, durante 24 hs. El número y estadio larval de los culícidos fue variable, debido a la limitada disponibilidad de hospedadores. Las larvas se colocaron en recipientes plásticos de 250 ml con 100 ml de agua declorinada. Para determinar la viabilidad de las formas preparásitas del nemátodo se expusieron 50 larvas de estadio II de *A. aegypti* como especie susceptible, con una dosis de 10:1 preparásitos por hospedador. Los culícidos se observaron bajo microscopio óptico y estereoscópico para determinar la susceptibilidad al nemátodo. Se determinó la prevalencia y la intensidad parasitaria para cada estadio y especie.

12.2. Susceptibilidad de hospedadores no culícidos a *S. spiculatus* en el laboratorio

Se evaluó la capacidad infectiva de *S. spiculatus* en organismos hallados en sitios de cría naturales del nemátodo, ubicados en los alrededores de La Plata. Los organismos recolectados se expusieron en el laboratorio a los estadios infectantes de *S. spiculatus*. El número de L2 por hospedador utilizado en las experiencias fue variable. Las infecciones se realizaron en recipientes plásticos de 250 ml de capacidad, con 100 ml de agua declorinada. Los ejemplares se

observaron bajo microscopio estereoscópico y óptico durante 10 días para determinar el parasitismo. Para conocer la viabilidad de las formas preparásitas se expusieron larvas de estadio II del culícido *A. aegypti* como especie susceptible, en una relación de 10:1 preparásitos por hospedador.

13. Introducción del nemátodo *S. spiculatus* en criaderos naturales de culícidos

13.1. Área de aplicación de los estados preparásitos del nemátodo *S. spiculatus*

Con el objetivo de determinar la capacidad del nemátodo *S. spiculatus* de parasitar culícidos a campo, se llevó a cabo la introducción de los estados infectantes en 4 sitios de cría:

13.1.1. Ambientes artificiales

SITIO 1:

El sitio 1 estuvo compuesto por recipientes de plástico de 11 cm de diámetro y 1000 ml de capacidad (Fig. 13). El agua provino exclusivamente de precipitaciones. Los recipientes se ubicaron en el exterior, en el CEPAVE y fueron colonizados naturalmente por el culícido *Aedes aegypti*.

SITIO 2:

Estuvo constituido por tanques de plástico, de 50 cm de diámetro y 90 litros de capacidad. El agua de los recipientes provino exclusivamente de precipitaciones. Se localizaron externamente en el CEPAVE donde se

colonizaron naturalmente por los culícidos (Fig. 14). Estos ambientes fueron colonizados por los culícidos *Aedes aegypti*, *Culex apicinus* y *Culex pipiens*.

13.1.2. Ambientes permanentes

SITIO 3:

Este criadero estuvo constituido por zanjas cuyo aporte de agua se origina de los desagües domiciliarios y las precipitaciones pluviales. Se ubicaron en las localidades de La Granja y Romero, partido de La Plata (Fig. 3 A y B). Este ambiente constituye un sitio de cría del culicido *C. pipiens*.

13.1.3. Ambientes temporarios

SITIO 4:

El sitio 4, se ubicó en la Reserva Natural de Punta Lara. Consistió en una hondonada de 6 m de largo, 3 m de ancho, y 0,5 m de profundidad. El agua provino exclusivamente de las precipitaciones pluviales y los desbordes de arroyos aledaños, producto de las variaciones de nivel del Río de La Plata (Fig. 4). En este ambiente crían las especies de culícidos *O. crinifer* y *P. ferox*.

Figura 13. Ambiente de cría de culícidos (sitio 1) donde se liberó el nemátodo *Strelkoviimermis spiculatus*.



Figura 14. Ambiente de cría de culícidos (sitio 2) donde se liberó el nemátodo *Strelkoviimermis spiculatus*.



13.2. Metodología utilizada en la liberación de los estados preparásitos del nemátodo *S. spiculatus*

La introducción del nemátodo *S. spiculatus*, se realizó en poblaciones naturales de *A. aegypti*, *C. apicinus*, *C. pipiens*, *O. crinifer* y *P. ferox*. Durante el período en el que se llevaron a cabo las experiencias, las especies de culícidos no compartieron el mismo ambiente, con la excepción de *O. crinifer* y *P. ferox*, que se encontraron criando en el mismo sitio en el momento de las liberaciones. Previo a la introducción de los preparásitos del nemátodo, se determinó el número y estadio larval de los culícidos y se observaron bajo microscopio estereoscópico y óptico para descartar el parasitismo por *S. spiculatus* en estos criaderos. Se registró la temperatura del agua en los ambientes. El número de L2 aplicado en el sitio 1 fue de 10:1 y 20:1 L2/hospedador. Las dosis utilizadas en el sitio 2 variaron entre 1:1 y 300:1 L2/hospedador.

Debido a la mayor dimensión que presentan ciertos criaderos de culícidos se liberaron entre 1,5 y 7,5 x 10⁵ preparásitos por metro² en las zanjas de desagüe domiciliario y pluvial de la localidad de La Granja y entre 0,04 y 1,5 x 10⁶ para las zanjas de la localidad de Romero (sitio 3). En el sitio 4 el número de preparásitos varió entre 2,0 x 10³ y 7,5 x 10⁴ preparásitos por metro². A las 24 hs posteriores a la liberación de las L2, se recolectaron larvas de los culícidos provenientes de los diferentes criaderos y se transportaron al laboratorio para registrar el parasitismo por el nemátodo. Se determinó la prevalencia e intensidad de infección en cada criadero para cada especie, bajo microscopio óptico. Los porcentajes de infección se calcularon considerando los cuatro estadios larvales, excepto cuando se encontraron en los ambientes larvas pertenecientes a un solo estadio.

En el sitio 4 se determinó el porcentaje de organismos filtradores presentes en estos ambientes

14. Efecto de *S. spiculatus* en infecciones bacterianas en *C. pipiens*

14.1. Mortalidad larval por bacteriosis en poblaciones naturales de *C. pipiens*

En las zanjas de desagüe pluvio-domiciliario se observaron larvas de *C. pipiens*, infectadas por una bacteria no determinada hasta el momento. Las larvas de los culícidos se transportaron al laboratorio para determinar los porcentajes de infección. La prevalencia se determinó por observación bajo microscopio estereoscópico y óptico, de los ejemplares que mostraron una sintomatología externa, la cual consistió en el aspecto blanco lechoso de los ejemplares en el estadio IV. Para determinar la mortalidad larval debido a la presencia de la bacteria, las larvas de culícidos infectadas (n=25), se separaron en recipientes individuales de 8 cm de diámetro y 100 ml de agua declorinada. Diariamente se determinó el número de larvas muertas en los recipientes. Se utilizaron como control, recipientes con larvas no infectadas con la bacteria.

14.2. Interacción entre la bacteria y el nemátodo *S. spiculatus*

Debido a la observación de un incremento en el laboratorio de la bacteriosis en larvas de *C. pipiens* expuestas al nemátodo en agua proveniente de las zanjas de desagüe pluvio-domiciliario, respecto de las larvas provenientes de recipientes libres de formas infectantes, se evaluó en el laboratorio, si la penetración de las L2 de *S. spiculatus* en los culícidos, favorece el incremento de las infecciones por la bacteria. Por tal motivo se expusieron 100 larvas de estadio II de *A. aegypti* y *C. pipiens* conjuntamente al nemátodo y la bacteria. Para la obtención de la bacteria, las larvas de *C. pipiens* infectadas halladas en zanjas de desagüe domiciliario, se observaron en el laboratorio bajo microscopio estereoscópico y los individuos que mostraron sintomatología externa se separaron y se procesaron en un mortero con 2 ml de agua estéril. La suspensión obtenida se utilizó para las infecciones. Las larvas de culícidos se colocaron separadas por especie en recipientes plásticos de 20 x 30 cm con 1000 ml de agua declorinada. En cada recipiente se agregó 0,5 ml de la suspensión

con la bacteria y una relación de 10:1 preparásitos por hospedador. Cuando las larvas de culícidos llegaron a estadio IV, se determinó la prevalencia e intensidad. Por otra parte se utilizaron recipientes con larvas expuestas a la bacteria sin nemátodos y con larvas expuestas al nemátodo en ausencia de la bacteria. Se realizaron 3 repeticiones y 3 réplicas para cada caso.

Todas las experiencias mencionadas anteriormente se llevaron a cabo a 26 ± 1 °C, 85% de humedad relativa y fotoperíodo de 12:12 h (L:O).

Las diferencias observadas en los resultados, se compararon estadísticamente por el Análisis de la Varianza (ANOVA) y las comparaciones múltiples resultantes fueron estudiadas por la prueba de Tukey (Sokal y Rohlf, 1985). Cuando los valores no mostraron homogeneidad de varianzas se transformaron a arcoseno antes del análisis.

RESULTADOS

1. Prospección de *S. spiculatus* en criaderos de culícidos

La prospección de *S. spiculatus* en ambientes temporarios de culícidos se llevó a cabo entre abril de 1999 y febrero de 2002. La presencia del nemátodo en las larvas de *O. albifasciatus*, se registró en los 3 sitios de cría muestreados, con porcentajes de infección que alcanzaron 90%.

En el sitio de cría denominado 1, la presencia de *S. spiculatus* se registró solamente durante el mes de abril de 1999, con una prevalencia de 90%. Durante el año 2000 el nemátodo se registró en los meses de agosto y diciembre con una prevalencia promedio de 25% y 34% respectivamente. En el tercer año de muestreo (2001), la presencia de *S. spiculatus* se observó en las larvas de *O. albifasciatus* en los meses de mayo (75%), octubre (50%) y diciembre (25%). Si bien se registró la presencia de larvas de este culícido durante los meses de julio de 1999 y en los meses de febrero, abril, mayo y octubre de 2000, no se halló infección por el nemátodo durante este período. En este ambiente se registró la presencia de larvas de otras especies de culícidos parasitados por *S. spiculatus*. Se hallaron larvas de *P. cyanescens* parasitadas en marzo de 2001, con un porcentaje de infección de 28,3% y larvas de *P. ciliata* en enero de 2002, con una prevalencia de 5%.

En el sitio denominado 2, se determinó la presencia de *S. spiculatus* en larvas de *O. albifasciatus*, en el mes de abril de 1999, con una prevalencia de 90%. Durante los meses de julio, agosto y setiembre de 1999, abril y agosto de 2000 y setiembre y octubre de 2001, se hallaron larvas de esta especie aunque no se detectaron infecciones por el nemátodo. En marzo de 2001, se observaron larvas de *C. dolosus* parasitadas por el nemátodo, en este sitio, con un valor de infección de 29%.

En el sitio denominado 3, la presencia del nemátodo se determinó en las larvas de *O. albifasciatus* en febrero de 2001 con 10% de prevalencia. En los meses

de abril y setiembre de 2000 y mayo de 2001 y enero de 2002, se hallaron larvas de *O. albifasciatus* pero no se determinó la presencia del nemátodo.

Entre marzo de 2001 y enero de 2002 se extendió la prospección de *S. spiculatus* en culícidos, a otros ambientes temporarios. Los muestreos se llevaron a cabo en varias oportunidades en sitios de cría de *O. albifasciatus*, (10 en total) ubicados en las localidades de Melchor Romero, City Bell, Villa Elisa y Abasto, partido de La Plata. La presencia del nemátodo se registró en el 60% de los ambientes, con prevalencias que variaron entre 5 y 100% para las diferentes especies de culícidos. El nemátodo se halló parasitando larvas de *C. chidesteri*, *C. dolosus*, *C. maxi*, *O. albifasciatus*, *P. ciliata* y *P. cyanescens* (Tabla 1). El mayor valor de parasitismo se obtuvo en el hospedador, *O. albifasciatus*, con porcentajes de infección de 100%.

Tabla 1. Parasitismo de *S. spiculatus* en larvas de culícidos recolectadas en ambientes temporarios. (N = número de larvas recolectadas).

Hospedadores	Parasitismo (%)	Rango (%)	Intensidad media	N
<i>Anopheles sp.</i>	0	0		8
<i>Culex chidesteri</i>	10	0-50	1,1	49
<i>C. dolosus</i>	16,1	0-50	1,4	235
<i>C. maxi</i>	2,8	0-5	1,5	71
<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	46	0-100	1,7	1983
<i>Psorophora ciliata</i>	5	0-5	1	20
<i>P. cyanecens</i>	1,6	0-28,3	8	124
<i>P. ferox</i>	0	0		1
<i>Uranotaenia sp.</i>	0	0		1

La prevalencia en el resto de las especies de culícidos parasitadas por *S. spiculatus* no superó el 50%. La intensidad varió entre 1,1 y 8. El mayor número de nemátodos por larva (8) se observó en larvas de *P. cyanescens*.

Si bien en los ambientes temporarios donde se registró la presencia del nemátodo se hallaron larvas de 9 especies de culícidos, *O. albifasciatus* constituyó la especie más abundante.

La presencia de *S. spiculatus* en culícidos adultos fue detectado en *O. albifasciatus* durante el mes de mayo de 2001 en un sitio de cría ubicado en el partido de Berazategui. La prevalencia fue de 10,3% con valores máximos de 20%. Larvas III de *S. spiculatus* melanizadas fueron observadas en 11% de los adultos en uno de los muestreos.

En los ambientes artificiales y permanentes donde se realizó la prospección de culícidos, se registraron larvas de *A. aegypti*, *C. apicinus* y *C. pipiens*, pero no se registró la presencia del nemátodo.

2. Utilización de *A. aegypti* y *C. pipiens* como hospedadores para la cría del nemátodo *S. spiculatus*

2.1. Efecto de la variación del número de estados preparásitos de *S. spiculatus* sobre la prevalencia en las larvas de *A. aegypti*

Los valores de infección obtenidos al utilizar el culícido *A. aegypti* como hospedador para la cría del nemátodo *S. spiculatus*, variaron entre 75 y 100% para las diferentes dosis de preparásitos por hospedador utilizadas (Tabla 2). El número promedio de nemátodos por larva alcanzó valores entre 1,7 y 2,6 para las 4 dosis (Tabla 2). No se observaron diferencias significativas para la prevalencia (F: 1,92; g.l: 3, 31; $p > 0,14$) e intensidad (F: 0,6; g.l: 3, 31; $P > 0,62$) entre las 4 dosis. El mayor porcentaje de estados preparásitos de *S. spiculatus* que logró penetrar, desarrollarse y emerger como estados postparásitos fue $48\% \pm 6\%$, para una dosis de 3:1 (P/H). Se observaron diferencias significativas al

analizar el porcentaje de nemátodos recuperados entre dosis (F: 3, 8; g.l: 3, 17; P < 0,02). Las diferencias se observaron entre la dosis de 10:1 y el resto (Tukey P < 0,05) (Tabla 2).

2.2. Efecto de la variación del número de estados preparásitos de *S. spiculatus* sobre la prevalencia en las larvas de *C. pipiens*

Los porcentajes de infección obtenidos en las larvas del culícido *C. pipiens* alcanzaron valores entre 72% y 100% para las diferentes dosis. La intensidad varió entre 2,4 y 2,9 nemátodos por larva (Tabla 3). No se observaron diferencias significativas para la prevalencia (F: 1,36; g.l: 3, 20; P >0,28) e intensidad (F: 0,14; g.l: 3, 41; P >0,93) entre las 4 dosis. El mayor porcentaje de nemátodos que ingresaron a las larvas de *C. pipiens* como estados preparásitos y emergieron como estados postparásitos fue 49% ± 12% para la dosis de 3 :1 preparásitos por hospedador. Se observaron diferencias significativas al analizar el porcentaje de nemátodos recuperados entre dosis (F: 5,45; g.l: 3, 16; P < 0,01). Las diferencias se registraron entre la dosis de 3:1 y 10:1 (Tukey P < 0,05) (Tabla 3).

Tabla 2. Efecto de la variación del número de estados preparásitos de *S. spiculatus* sobre la prevalencia, intensidad y eficiencia en larvas de *A. aegypti*. Diferentes letras indican que existen diferencias significativas (Tukey P > 0,05).

<i>A. aegypti</i>				
R.P/H	Prevalencia (%) (± DE)	Rango (%)	Intensidad (± DE)	Eficiencia (%) (± DE)
3:1	82,7 ± 5,6	75-89	1,7 ± 0,2	48 ± 6 a
5:1	89,0 ± 6,9	79-100	2,4 ± 1,1	36 ± 14 a
8:1	92,0 ± 7,3	86-100	2,3 ± 1,3	44 ± 5 a
10:1	91,3 ± 6,3	81-100	2,6 ± 0,8	18 ± 3 b

Tabla 3. Efecto de la variación del número de estados preparásitos de *S. spiculatus* sobre la prevalencia, intensidad y eficiencia en larvas de *C. pipiens*. Diferentes letras indican que existen diferencias significativas (Tukey $P > 0,05$).

<i>C. pipiens</i>				
R.P/H	Prevalencia (%) (± DE)	Rango (%)	Intensidad (± DE)	Eficiencia (%) (± DE)
3:1	91,3 ± 10,0	82-100	2,4 ± 0,7	49 ± 12 a
5:1	87,7 ± 10,6	72-100	2,9 ± 1,4	30 ± 6 ab
8:1	96,6 ± 4,5	92-100	2,9 ± 1,7	29 ± 18 ab
10:1	96,3 ± 7,4	80-100	2,6 ± 0,8	24 ± 9 b

2.3. Susceptibilidad de los estadios larvales de *A. aegypti* a *S. spiculatus*

Los porcentajes de infección de las larvas de estadio I, II, III y IV de *A. aegypti* expuestas a *S. spiculatus* variaron entre 41% y 98% (Tabla 4). Se observaron diferencias significativas en los porcentajes de infección (F: 44,83; g.l: 4, 24; $P < 0,001$) entre las larvas de estadio IV y el resto (Tukey $P < 0,05$) (Tabla 4). La prevalencia más elevada (98% ± 4%) se obtuvo en las larvas de estadio I mientras que el menor valor (41% ± 6%) se observó en larvas en estadio IV. El promedio de nemátodos por larva para los diferentes estadios varió entre 1,1 y 2,8. La mayor intensidad se registró en las larvas de estadio I con un promedio de 2,8 ± 0,9 nemátodos por larva (Tabla 5).

2.4. Susceptibilidad de los estadios larvales de *C. pipiens* a *S. spiculatus*

Los porcentajes de infección para las larvas de estadio I, II, III y IV de *C. pipiens* variaron entre 11 y 95% (Tabla 4). La prevalencia más elevada (95% ± 5%) se registró en las larvas de estadio I, mientras que el menor porcentaje (11% ± 5%) se obtuvo en las larvas de estadio IV. Se observó diferencias significativas para la prevalencia (F:26,05; g.l: 3, 18; $P < 0,001$). Las principales diferencias se observaron en los porcentajes de infección entre las larvas en los estadios III y

IV con el resto de los estadios (Tukey $P < 0,05$) (Tabla 4). La intensidad varió entre 1 y 2,3. El mayor número de nemátodos por larva ($2,3 \pm 0,7$) se registró en las larvas de estadio II (Tabla 5). No se observaron diferencias significativas para la intensidad.

El 75% de las larvas de *A. aegypti* y *C. pipiens*, infectadas con *S. spiculatus* en estadio IV, extendieron la duración del estado larval hasta la liberación de los postparásitos, permaneciendo en dicho estadio 5 días aproximadamente mientras que las larvas de estadio IV libres de nemátodos, pasaron al estadio de pupa en 48 a 72 hs.

Tabla 4. Porcentaje de infección por el nemátodo *S. spiculatus* en los estadios larvales de *A. aegypti* y *C. pipiens*. Diferentes letras indican que existen diferencias significativas (Tukey $P > 0,05$).

Hospedador	Prevalencia (%)			
	L1	L2	L3	L4
<i>A. aegypti</i>	98 ± 4 a	94 ± 5 a	87 ± 4 a	41 ± 6 b
<i>C. pipiens</i>	95 ± 5 A	92 ± 9 A	76 ± 8 B	11 ± 5 C

Tabla 5. Intensidad de *S. spiculatus* por estadio larval de *A. aegypti* y *C. pipiens*.

Hospedador	Intensidad			
	L1	L2	L3	L4
<i>A. aegypti</i>	$2,8 \pm 0,9$	$2,1 \pm 0,6$	$2,1 \pm 1,0$	$1,1 \pm 0,1$
<i>C. pipiens</i>	$1,0 \pm 0,0$	$2,3 \pm 0,7$	$1,6 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,3$

3. Producción masiva de estados postparásitos (L4) de *S. spiculatus*

La exposición de 10.000 larvas de estadio II de *A. aegypti* a dosis variables de preparásitos entre 1:1 y 10:1 (L2/hopedor) produjo con las diferentes dosis utilizadas entre 1,0 y 3,5 gramos de estados postparásitos (Tabla 6). El valor más elevado de L4 de *S. spiculatus* obtenido (3,5 gramos) se alcanzó con la dosis 10:1 L2/hopedor. Se registraron diferencias significativas en la producción de postparásitos entre dosis (F: 10,34; g.l: 6, 42; P < 0,001). El número de gramos obtenidos con la dosis de 10:1 L2/hopedor fue significativamente diferente respecto de las demás dosis evaluadas (Tukey P < 0,05) (Tabla 6). La prevalencia fue 48,0% para la dosis de 1:1 preparásitos por hospedador, 53,0% con 2:1, 72,0% con 3:1, 81,1% con 4:1, 87,5% con 5:1, 83,6% con 7:1 y 94,9% con 10:1. La intensidad varió entre 1,2 y 3,1 nemátodos por larva (Tabla 6). El mayor porcentaje de estados preparásitos que logró penetrar, desarrollarse y emerger como L4 de las larvas de *A. aegypti* fue 32% y se alcanzó con la relación 1:1 preparásitos por hospedador. Si bien el mayor número de nemátodos postparásitos (9.700) se obtuvo al utilizar la dosis de 10 preparásitos por hospedador, la eficiencia de esta dosis fue la menor de las utilizadas (10%) (Tabla 6). Se observó un leve incremento en el número de machos al aumentar la dosis a 10:1 L2/hopedor. El número promedio de nemátodos postparásitos que posee un gramo con una relación de sexos de 1♀: 1♂ fue 3.200, variando entre 1.600 y 5.100.

Tabla 6. Producción masiva de estados postparásitos de *S.spiculatus* con diferentes relaciones de preparásitos por hospedador. (R = número de repeticiones; R. S. = Relación de sexos ♀/♂; D.S= dosis con las cuales presentaron diferencias significativas para la producción de L4 en gramos. (Tukey P < 0,05).

P/H	Prevalencia (%)	Intensidad	Producción (gramos)	Rango (gramos)	R	R. S.	Eficiencia (%)	N° postparásitos	D. S
1:1	48,0 ± 14,6	1,2 ± 0,3	1,05	0,7 - 1,9	6	1,0:1,0	32	2.900	5:1; 7:1; 10:1
2:1	53,0 ± 24,3	1,2 ± 0,2	1,10	0,8 - 1,8	4	1,0:1,0	16	3.100	7:1; 10:1
3:1	72,0 ± 15,0	1,3 ± 0,2	1,38	1,0 - 1,9	6	1,4:1,0	13	4.000	10:1
4:1	81,1 ± 8,1	1,7 ± 1,0	2,15	1,5 - 2,5	4	2,6:1,0	16	6.200	10:1
5:1	87,5 ± 10,9	2,0 ± 0,7	2,18	1,3 - 3,1	11	1,2:1,0	13	6.300	10:1
7:1	83,6 ± 6,8	1,9 ± 0,0	3,08	2,5 - 3,8	4	1,3:1,0	13	8.900	5:1
10:1	94,9 ± 9,5	3,1 ± 1,2	3,50	2,5 - 4,0	10	1,0:2,5	10	9.700	1:1;2:1;3:1;4:1;5:1;7:1

4. Producción de estados preparásitos (L2) en cultivos de *S. spiculatus*

4.1. Producción de estados preparásitos de *S. spiculatus* en cultivos inundados semanalmente

El número total de formas preparásitas obtenidas en los cultivos a través de las sucesivas inundaciones semanales varió entre 0,18 y $1,2 \times 10^6$ para las 3 relaciones de sexo estudiadas (Tabla 7). El mayor número promedio de formas infectantes producidas en un cultivo ($6,8 \times 10^5$) se logró con la relación de sexos de 1:1,5 (♀/♂). La mayor eclosión de formas preparásitas se alcanzó en la primera inundación de los cultivos para todas las relaciones de sexo. El número de preparásitos disminuyó con las sucesivas inundaciones. Se observó la eclosión de las L2 durante 10 semanas consecutivas (Fig. 15). Las L2 permanecieron infectivas en todas las inundaciones que sufrieron los cultivos para las 3 relaciones de sexos, con valores de infección que superaron siempre el 80%. Por tal motivo los resultados de infectividad de los cultivos para las 3 relaciones de sexo, se analizaron en forma conjunta (Tabla 8).

4.2. Producción de estados preparásitos de *S. spiculatus* en cultivos inundados permanentemente

El promedio total de L2 obtenidas en los cultivos que permanecieron continuamente inundados, fue $0,6 \times 10^5$ variando entre 0,5 a $0,7 \times 10^5$ en cultivos con una relación de sexos de 2♀:1♂. La mayor producción de estados preparásitos se registró entre las semanas 6 y 8 (Fig. 16). Los estados preparásitos siempre conservaron la capacidad de infectar con porcentajes de parasitismo que variaron entre 70 y 100% y una intensidad entre 1,4 y 4,0 (Tabla 9). Cuando la relación de sexos de los nemátodos en los cultivos fue 1♀:2♂, la producción total de formas infectantes fue 2×10^3 . El número más elevado de L2 producidas se determinó durante la semana 13 (Fig. 17). Las formas

preparásitas del nemátodo no perdieron la capacidad de infectar, registrándose una prevalencia entre 60 y 100% (Tabla 10).

Tabla 7. Número total de formas infectantes producidas en los cultivos con 1 gramo de juveniles postparásitos, a través de las sucesivas inundaciones semanales. Promedio de 3 repeticiones (R.S = relación de sexos ♀/ ♂).

R.S	Nº preparásitos	Rango
1,0:1,5	$6,8 \times 10^5$	$0,20 - 1,20 \times 10^6$
1,0:1,0	$2,9 \times 10^5$	$0,18 - 0,37 \times 10^6$
2,0:1,0	$3,0 \times 10^5$	$0,27 - 0,35 \times 10^6$

Fig. 15. Producción de estados preparásitos en cultivos sometidos a inundaciones semanales.

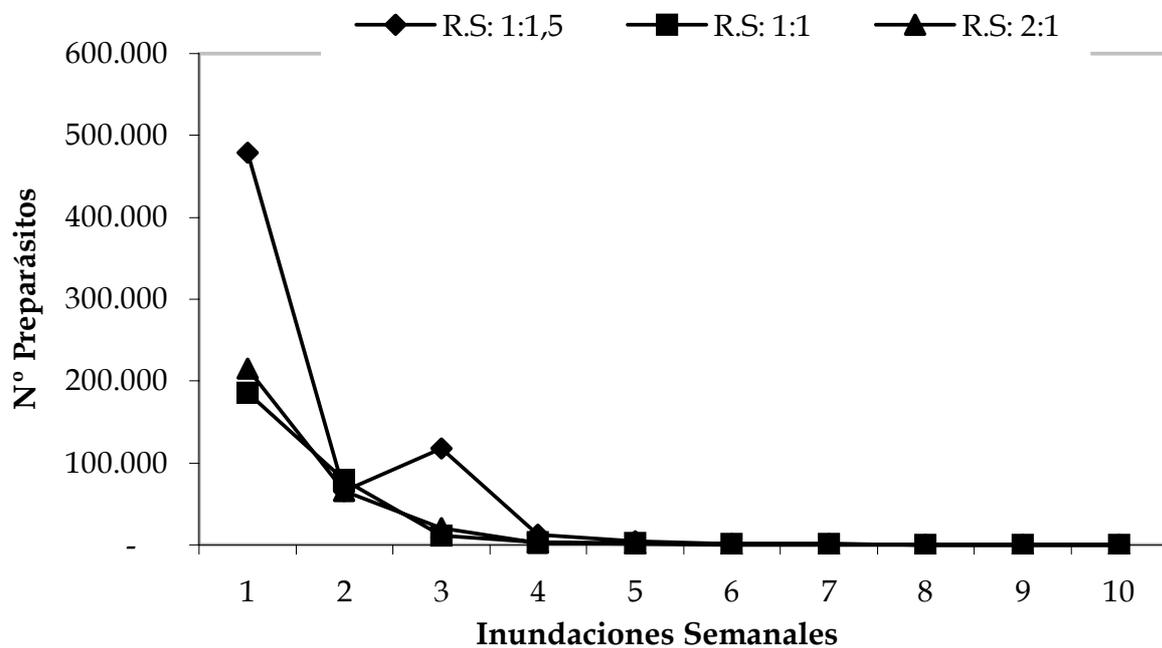


Tabla 8 Infectividad de *Strelkovimermis spiculatus* en cultivos expuestos a inundaciones semanales (Promedio de los cultivos con las 3 relaciones de sexos).

Semana	Prevalencia	Intensidad
1	94,3 ± 5,6	1,8 ± 0,33
2	94,1 ± 7,9	2,1 ± 0,7
3	95,0 ± 5,7	2,1 ± 0,5
4	97,0 ± 4,7	3,0 ± 1,6
5	100	3,3 ± 1,3
6	100	5,7 ± 0,5
7	90,0 ± 14,1	1,8 ± 0,6
8	95,0 ± 8,7	1,9 ± 0,8
9	98,1 ± 3,2	2,4 ± 1,8
10	93,3 ± 11,5	1,9 ± 0,8

Fig. 16. Producción de estados preparasitos en cultivos con 1 gramo de juveniles postparasitos y una relación de sexos de 2♀: 1♂, sometidos a inundaciones permanentes.

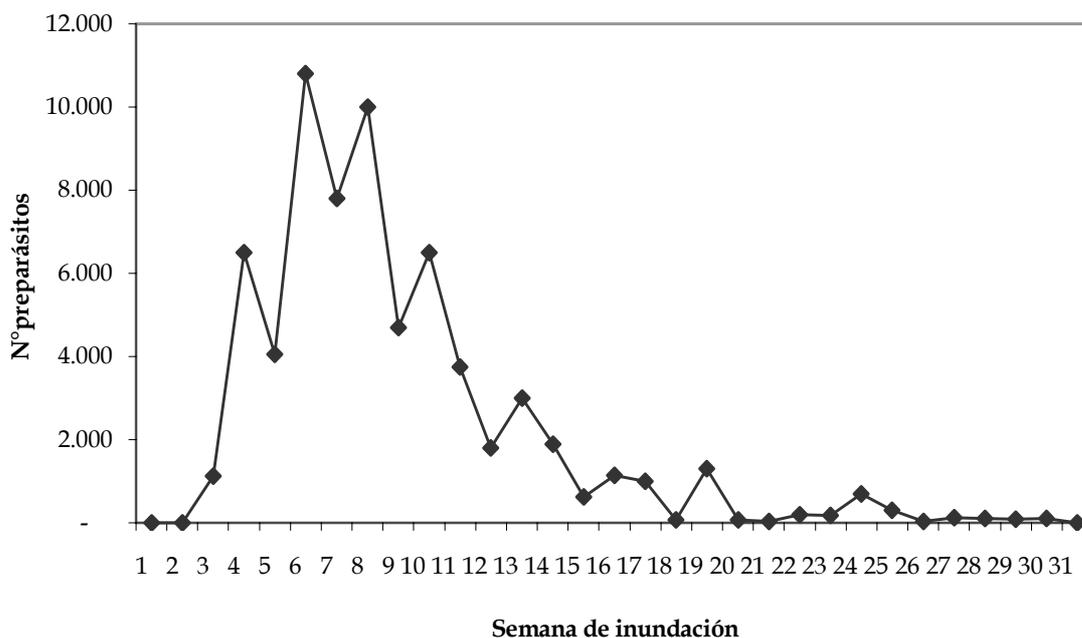


Tabla 9. Infectividad de estados preparasitos de *Strelkovimermis spiculatus* en cultivos expuestos a inundaciones permanentes para una relación de sexos de 2♀:1♂.

Semana	% Infección	Intensidad
1	97,0 ± 3,0	2,7 ± 0,4
2	92,6 ± 7,3	3,6 ± 1,0
3	80,0 ± 14,7	2,1 ± 0,7
4	81,3 ± 5,2	1,5 ± 0,1
5	93,7 ± 9,5	2,9 ± 0,8
6	87,3 ± 9,5	2,8 ± 1,4
7	98,1 ± 3,2	2,6 ± 1,8
8	85,0 ± 15	2,9 ± 1,9
9	86,0 ± 14	2,4 ± 0,8
10	91,2 ± 8,7	2,5 ± 1,1
11	92,1 ± 7,8	3,4 ± 1,5
12	80,0	2,3
13	70,0	2,8
14	94,6 ± 5,3	2,0 ± 0,02
15	100	1,3
16	78,3	2,0
17	73,0	1,4
18	83,0	1,6
19	70,0	1,0
20	100	2,0
21	82,0	2,2
22	75,0	2,3
23	80,0	2,0
24	83,0	1,5
25	91,6	2,5
26	100	4,0
27	83,0	1,5
28	91,6	2,5
29	100	4,0

Fig. 17. Producción de estados preparasitos en cultivos con una relación de sexos de 1 ♀: 2♂ sometidos a inundaciones permanentes.

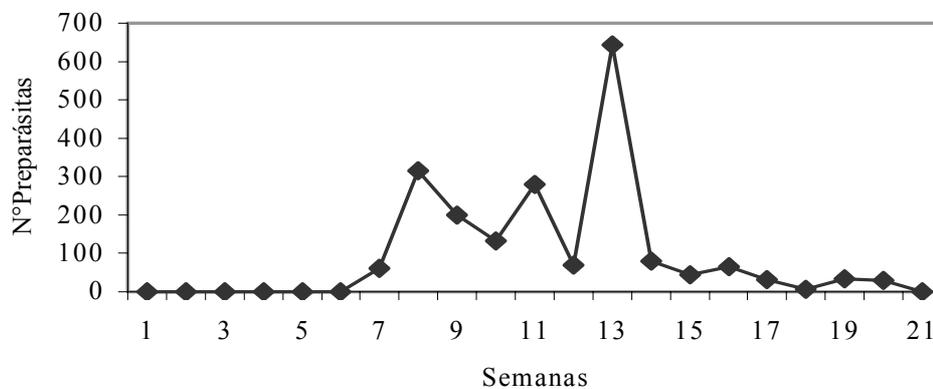


Tabla 10. Infectividad de estados preparásitos de *Strelkovimermis spiculatus* en cultivos expuestos a inundaciones permanentes para una relación de sexos de 1♀:2♂.

Semana	Prevalencia (%)	Intensidad
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	100	2,4
8	100	2,7
9	100	5,2
10	70	1,5
11	83	2,2
12	100	3,0
13	75	2,0
14	75	2,0
15	100	1,0
16	60	1,8
17	60	1,0
18	80	1,0
19	80	4,3
20	60	1,0

5. Efecto de la variación del tiempo de conservación de los cultivos de *S. spiculatus* en la producción e infectividad de estados preparásitos

La mayor producción de L2 en los cultivos con un gramo de nemátodos enterrados para las 4 relaciones de sexo estudiadas, se obtuvo cuando los cultivos se inundaron al cumplirse 5 semanas de almacenamiento. El número más elevado en cultivos se obtuvo con una relación de sexos de 1♀: 1,5♂ con un promedio de $5,5 \times 10^5$ L2, variando la producción entre $4,1 \times 10^5$ y $8,1 \times 10^5$ L2 (Tabla 11). El número de L2 obtenidos en los cultivos disminuyó (entre 32 y 55%) al inundarlos a partir de las 10 semanas de almacenamiento para las diferentes relaciones de sexos. Los preparásitos fueron infectivos en todos los cultivos almacenados por períodos diferentes, habiéndose obtenido porcentajes

entre 78,5 y 95,0% de infectividad con una relación de preparásitos por hospedador de 10:1, variando la intensidad entre 1,3 y 2,5 nemátodos por larva (Tabla 12).

Tabla 11. Producción de estados preparásitos de *S. spiculatus* en la primera inundación de los cultivos almacenados a diferentes tiempos (R. S. = Relación de Sexos ♀/♂, n = número de cultivos).

R.S	Tiempo de almacenamiento (Semanas)	Nºpreparásitos	Rango
1,0:1,0	5	$2,8 \times 10^5$ (n=3)	(2,5 - $3,3 \times 10^5$)
	10	$1,1 \times 10^5$ (n=3)	(0,6 - $2,1 \times 10^5$)
	15	$2,7 \times 10^4$ (n=4)	(1,2 - $6,0 \times 10^4$)
	20	$4,9 \times 10^4$ (n=4)	(3,8- $7,0 \times 10^4$)
1,0:1,5	5	$5,5 \times 10^5$ (n=3)	(4,1- $8,1 \times 10^5$)
	10	$1,4 \times 10^5$ (n=1)	
	15	$5,5 \times 10^4$ (n=2)	(4,5- $5,5 \times 10^4$)
	20	$5,0 \times 10^4$ (n=4)	(2,6- $5,0 \times 10^4$)
2,0:1,0	5	$2,6 \times 10^5$ (n=4)	(1,7- $6,0 \times 10^5$)
	10	$1,5 \times 10^5$ (n=7)	(0,8- $4,0 \times 10^5$)
	15	$1,4 \times 10^4$ (n=2)	(1,2- $1,4 \times 10^4$)
1,0:2,0	5	$8,1 \times 10^4$ (n=1)	
	10	$1,6 \times 10^5$ (n=2)	(0,4- $1,6 \times 10^5$)
	15	$3,3 \times 10^4$ (n=3)	(2,0- $5,5 \times 10^4$)

Tabla 12. Infectividad de los estados preparásitos de *S. spiculatus* provenientes de cultivos almacenados a diferentes tiempos en larvas de *Aedes aegypti*.

Tiempo de almacenamiento (semanas)	Prevalencia (%)	Intensidad (%)
5	$78,5 \pm 1,5$	$1,3 \pm 0,1$
10	$85,0 \pm 10,8$	$2,5 \pm 1,6$
15	$95,0 \pm 5$	$2,5 \pm 0,6$
20	82,6	1,6

6. Longevidad de las formas adultas de *S. spiculatus*

Los estados postparásitos de *S. spiculatus*, vivieron 35 días cuando permanecieron en las cápsulas con agua. El porcentaje de nemátodos (L4) que sobrevivió en la semana 1 fue 85%, 40% en la semana 2, 15% en la semana 3 y 5% en la semana 4.

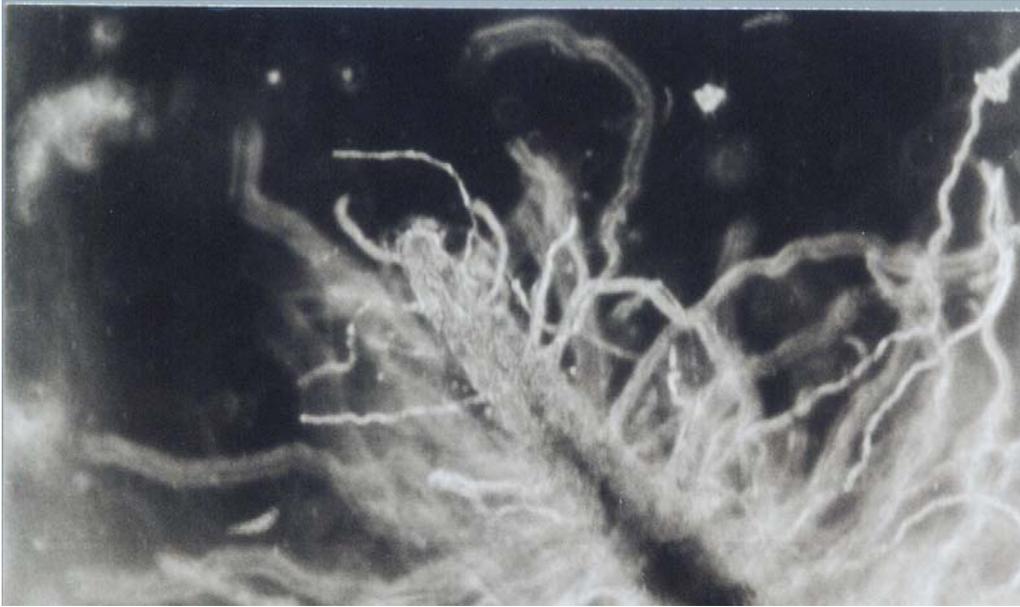
7. Evaluación de ciertos factores que pueden afectar la viabilidad e infectividad de los estados preparásitos de *S. spiculatus*

7.1. Presencia de agentes patógenos en cultivos de *S. spiculatus*

En las colonias del nemátodo *S. spiculatus*, se determinó la presencia de dos géneros diferentes de hongos. El primero presumiblemente perteneciente al género *Myzocytiopsis* (Familia Myzocytiopsidae) que infectó los estados postparásitos y adultos del nemátodo (Fig. 18). Las infecciones se observaron a las 48-72 hs posteriores a la emersión de los estados postparásitos de las larvas de los culícidos. Los valores de infección tuvieron un valor promedio de 1% a las 24hs post-infección, 3% a las 48hs y 9% a las 72hs. Los nemátodos parasitados mostraron una mortalidad del 100%.

También se determinó la presencia de otro hongo patógeno perteneciente al género *Catenaria* sp. (Chytridiomycetes: Blastocladales) aunque en menor abundancia que *Myzocytiopsis* sp. No se determinó hasta el momento el porcentaje de infección en los juveniles y en los cultivos.

Figura 18. Estado postparásito del nemátodo *Strelkovimermis spiculatus* infectado con el hongo perteneciente al género *Mezocitiopsis* (Microscopio óptico 10x).



7.2. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la supervivencia, longevidad e infectividad de los juveniles preparásitos

La movilidad o ausencia de la misma en las L2, fue el criterio utilizado para la diferenciación de los preparásitos vivos o muertos, respectivamente. La longevidad de los preparásitos decreció a temperaturas elevadas (Tabla 13). La longevidad máxima presentó diferencias significativas ($F=76$, $GL=3$, 8 , $P < 0,001$) siendo mayor a la temperatura de 4 y 10°C, las cuales no variaron significativamente entre sí, pero fueron diferentes del resto de las temperaturas (Tukey $P < 0,05$). Esta presentó un máximo de 35 días a 4°C (0,6%), 30 días a 10°C (0,8%), 25 días a 20°C (0,5%) y 27 días a 27°C (0,7%). A las 48 hr 57%, 87%, 100% y 63% de los preparásitos sobrevivieron a 4, 10, 20 y 27°C respectivamente. Entre 21% y 77% de los preparásitos presentaron movilidad luego de expuestos a esas temperaturas durante 5 días, mientras que a los 10 días la longevidad de los preparásitos varió entre 9% y 33% (Fig. 19).

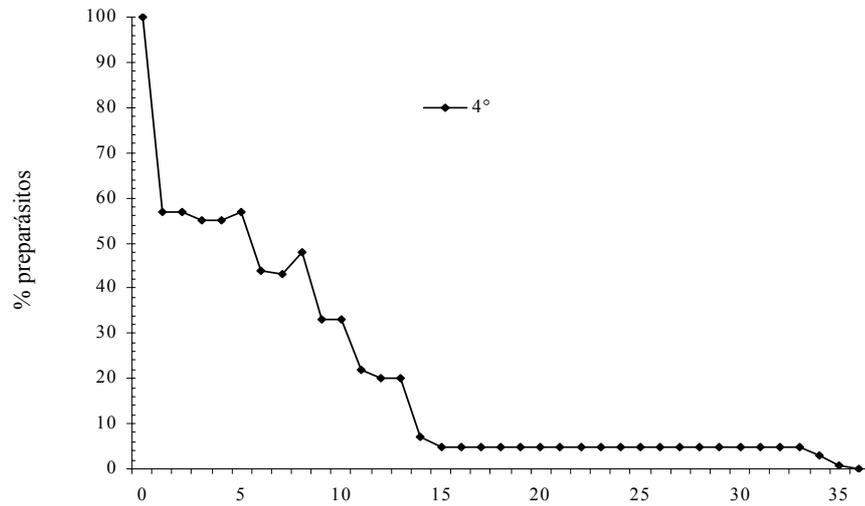
La relación entre la movilidad de los preparásitos y la capacidad para parasitar larvas de *A. aegypti* fue estudiada a 4, 10, 20 y 27°C. Los preparásitos expuestos a 4°C infectaron larvas de *A. aegypti* durante los 35 días que permanecieron móviles. El porcentaje de larvas parasitadas varió entre 85% y 100% con intensidades entre 1 y 2 nemátodos por larva parasitada. Los preparásitos mantenidos a 10°C parasitaron entre 80% y 100% de las larvas expuestas durante los 30 días de longevidad, oscilando la intensidad entre 1 y 2,4 nemátodos por larva. El parasitismo producido por los preparásitos mantenidos a 20°C fluctuó entre 70 y 100% durante los 25 días que se observaron preparásitos móviles. La intensidad del parasitismo por *S. spiculatus* varió entre 1 y 4 nemátodos por larva de *A. aegypti*. Los juveniles preparásitos que permanecieron viables durante 27 días a 27°C fueron infectivos y produjeron porcentajes de parasitismo entre 83% y 100%. El número de parásitos varió entre 1 y 2,3 nemátodos por larva de *A. aegypti* parasitada (Tabla 13).

Tabla 13. Supervivencia e infectividad de los estados preparásitos de *S.spiculatus* a 4, 10, 20 y 27°C.

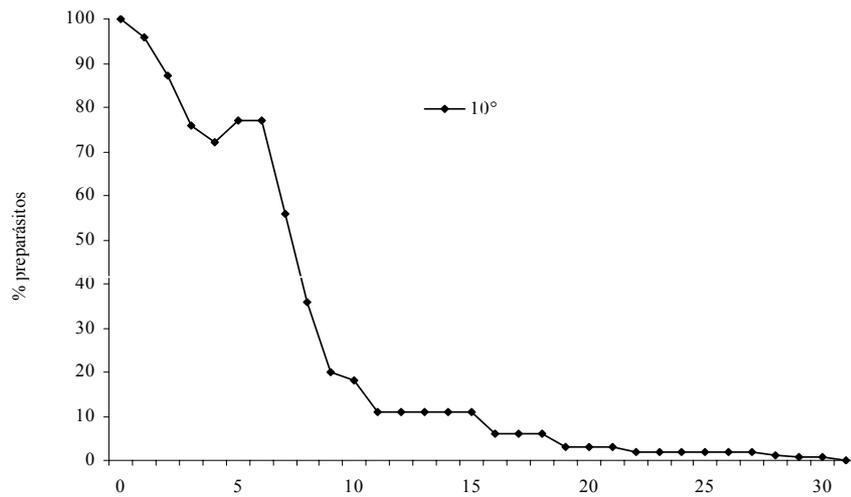
(N = número de preparásitos vivos de *S.spiculatus*, P = porcentaje de parasitismo, I = número de preparásitos por larva (intensidad))

Días	Temperatura											
	4°			10°			20°			27°		
	N	P	I	N	P	I	N	P	I	N	P	I
0	300	85	1,6	300	100	2,4	300	70	1,2	300	83	1,5
1	170	97	1	300	90	2,1	300	100	3,6	197	94	1,8
2	170	100	2,2	290	90	1,6	300	100	3,1	190	97	2,3
5	164	100	1	231	80	1,5	131	100	2,6	63	100	2,1
10	98	100	1,8	53	97	1,9	36	100	4	28	100	1,3
15	15	100	1,5	33	90	1,5	35	100	1,9	6	100	1
20	15	100	2	9	95	1,5	20	84	1	6	100	1
25	15	100	2	6	95	1	2	88	1	4	100	1
26	15	100	2	6	95	1	0			2	100	1
27	15	100	1,5	6	95	1				2	100	
28	15	100	1,5	4	95	1						
30	15	100	1,5	2	90	1						
31	15	100	1,5	0								
35	2	100	1									
36	0											

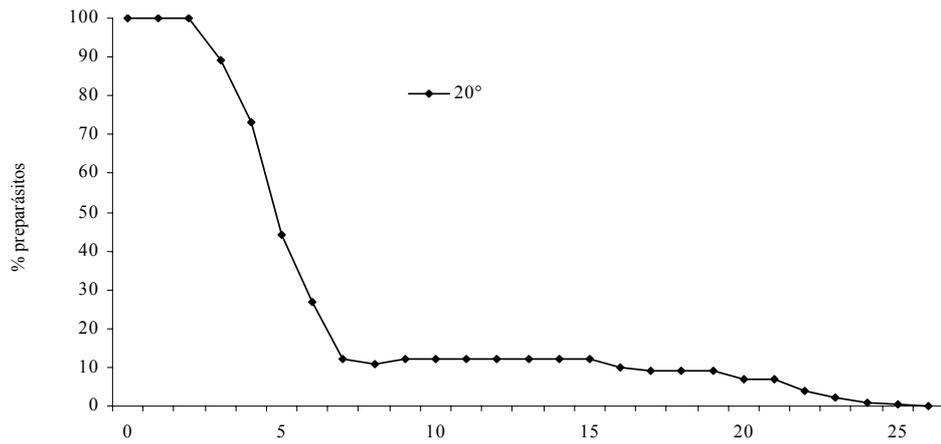
Fig.19. Supervivencia (%) de los preparásitos de *S.spiculatus* a 4°C (A), 10°C (B), 20°C (C) y 27°C (D).



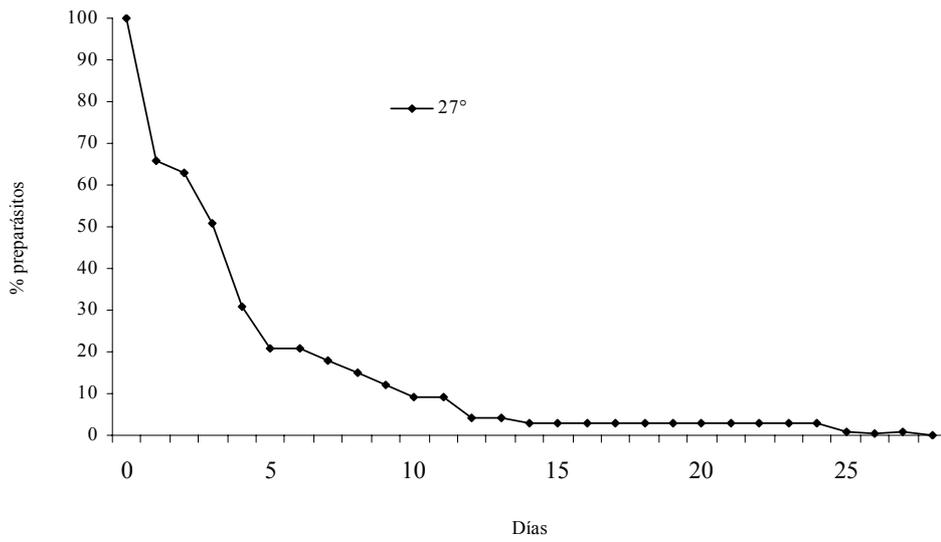
A



B



C



D

7.3. Efecto de la calidad del agua de los criaderos de culícidos sobre la supervivencia, longevidad e infectividad de los estados preparásitos de *S. spiculatus*

El efecto de las diferentes calidades de agua de los criaderos de culícidos sobre la viabilidad e infectividad de *S. spiculatus* se determinó previo a la introducción del nemátodo en los ambientes.

7.3.1. Capacidad infectiva de *S. spiculatus* en sitios de cría del culícido *C. pipiens*

La prevalencia registrada en este tipo de agua, fue considerablemente inferior que en el resto de las aguas evaluadas (Tabla 14). En las infecciones de *S. spiculatus* en las que se utilizó un gradiente creciente de agua de las zanjas de desagüe pluvial y domiciliario entre 0 y 100%, se determinó esta marcada reducción de los porcentajes de parasitismo en larvas de *A. aegypti* y *C. pipiens*, variando en las larvas de *C. pipiens* entre 89,3% (0% agua zanja) y 15,7% (100% agua de zanja) y entre 91,6% (0% agua zanja) y 5,0% (100% agua de zanja) en las larvas de *A. aegypti* (Tabla 15). La intensidad varió entre 3,4 (0% agua zanja) a 1 (100% agua de zanja) en larvas de *C. pipiens* y entre 2,5 (0% agua zanja) a 1,3 (100% agua de zanja) para las larvas de *A. aegypti*. En ambas especies de culícidos, el mayor número de nemátodos por larva se obtuvo en los controles con agua declorinada (Tabla 15). El mayor porcentaje de parasitismo alcanzado en agua de zanja fue 57% cuando se utilizó una dosis de 20:1 preparásitos por hospedador, en larvas de *C. pipiens* (Tabla 16).

Tabla 14. Parasitismo por *S. spiculatus* en diferentes clases de agua.

Agua	Prevalencia (%) <i>Aedes aegypti</i>
Corriente	94,7 ± 3,8
Desagües domiciliarios	5,0 ± 4,7
Arroyos y precipitaciones	97,1 ± 4,9
Precipitaciones	92,5 ± 2,0

Tabla 15. Capacidad infectiva de *S. spiculatus* en agua proveniente de zanjas de desagüe pluvial y domiciliario, sitios de cría del culícido *C. pipiens*.

A g u a Z a n j a (%)	P a r a s i t i s m o (%)		I n t e n s i d a d	
	<i>A. aegypti</i>	<i>C. pipiens</i>	<i>A. aegypti</i>	<i>C. pipiens</i>
0	91,6 ± 6,2	89,3 ± 1,4	2,5	3,4
10	73,3 ± 12,4	66,6 ± 4,7	1,3	1,5
20	53,5 ± 9,3	53,3 ± 4,7	1,3	1,7
30	36,7 ± 13,7	53,3 ± 4,8	1,1	1,7
40	25,0 ± 14,7	36,6 ± 9,4	1,0	1,0
50	15,0 ± 9,2	30,0 ± 8,1	1,0	1,8
60	24,0 ± 6,7	26,6 ± 9,4	1,0	1,0
70	11,0 ± 2,7	31,1 ± 8,0	1,0	1,3
80	2,0 ± 2,2	16,6 ± 4,7	1,0	1,0
90	4,0 ± 6,1	23,3 ± 4,7	1,5	1,5
100	5,0 ± 4,7	15,7 ± 6,9	1,3	1,4

Tabla 16. Parasitismo de *S. spiculatus* en agua proveniente de las zanjas de desagüe pluvial y domiciliario con diferentes dosis de preparábitos por hospedador.

Dosis	Prevalencia (%)	
	<i>A. aegypti</i>	<i>C. pipiens</i>
5:1	5% ± 5,0	10%
10:1	17% ± 4,2	5% ± 4,7
20:1	57,1%	10%

7.3.2. Viabilidad de los estados preparábitos de *S. spiculatus* en agua de zanjas de desagües pluviales y domiciliarios

El porcentaje promedio de los preparábitos existentes al transcurrir 4 hs de exposición en agua de zanja, fue 83,3% ± 4,7% , siendo 93% ± 10% en los controles con agua de clorinada. Transcurridas 24 hs de exposición, el porcentaje de preparábitos en el agua de las zanjas fue 19,1% ± 5,7% y 90% ± 5,5% en los controles. A las 48 hs, en el agua proveniente de las zanjas, solo se registró la

supervivencia de 1% de preparásitos mientras que en los controles se observó el 88% de L2 vivas.

7.3.3. Capacidad infectiva de *S.spiculatus* en agua proveniente de sitios de cría del culicido *O. albifasciatus*

El porcentaje de infección obtenido al utilizar una relación de preparásitos por hospedador de 10:1, en agua proveniente de este sitio de cría, para las larvas de *A. aegypti* se observan en la Tabla 14. El número de nemátodos por larva fue $2,0 \pm 0,4$.

7.3.4. Capacidad infectiva de *S. spiculatus* en sitios de cría de los culicidos *O. crinifer* y *P. ferox*

Cuando las infecciones se realizaron en agua proveniente de criaderos temporarios donde se desarrollan *O. crinifer* y *P. ferox*, la prevalencia en larvas de *A. aegypti* alcanzó un valor promedio de $97,1\% \pm 4,9\%$ variando entre 90% y 100% para una dosis de 10:1 preparásitos por hospedador. El número promedio de nemátodos por larva hospedadora fue $2,6 \pm 0,9$ variando entre 1,8 y 4,5.

7.3.5. Parámetros químicos del agua de los sitios de cría

La variabilidad observada en la viabilidad y capacidad infectiva de los preparásitos juveniles en diferentes aguas condujo a analizar las características físico-químicas de los tipos de agua evaluados. Estos análisis determinaron que los valores de amonio variaron entre 0,001 y 2,99 mg/l. El mayor valor de amonio (2,99 mg/l) se obtuvo en las muestras de agua de las zanjas de desagüe domiciliario, donde también se registró el mayor valor de fósforo (3,82mg/l). Los nitritos fueron muy similares en las 4 muestras de agua variando entre 0,017 y 0,023. El pH del agua fue ligeramente alcalino en todas las muestras, variando entre 7,2 y 7,8 (Tabla 17).

Tabla 17. Parámetros físico-químicos del agua de los criaderos de culícidos (1. agua declorinada, 2. agua de zanjas de desagüe pluvial y domiciliario, 3. agua proveniente de incrementos del nivel del Río de La Plata, 4. agua proveniente de las precipitaciones)

Muestra	Nitrato (mg N/l)	Nitrito (mg N/l)	Amonio (mg N/l)	Fosfato (mg P/l)	DQO (mg O ₂ /l)	Conductividad (/cm)	Ph
1	0,728	0,021	<0,001	0,03	94	813	7,7
2	0,395	0,017	2,99	3,82	62	1010	7,2
3	0,059	0,019	1,13	0,55	6	246	7,8
4	0,004	0,023	0,26	1,73	185	179	7,2

7.4. Efecto de la acción depredadora de copéodos sobre los estados preparásitos de *S. spiculatus*

Al evaluar la capacidad de depredación de adultos de diferentes especies de copéodos presentes en los ambientes temporarios del sistema *S. spiculatus* - *O. albifasciatus* se determinó que las cinco especies de copéodos evaluadas, *Acantocyclops robustus* (Sars, 1863), *Macrocyclops albidus* (Jurine, 1820) *Mesocyclops annulatus* y *Thermocyclops* sp. (Kiefer, 1927) (Cyclopoidea) y *Argyrodiaptomus bergi* (Richard, 1897) (Calanoidea), depredaron juveniles preparásitos de *S. spiculatus* (Tabla 18).

Adultos machos y hembras de *M. annulatus* consumieron 100% (n=10) de los preparásitos, mientras que los copéodos juveniles depredaron 93% \pm 5,77% de los nemátodos.

En los estudios realizados para determinar el número máximo de juveniles preparásitos consumidos por hembras adultas de *M. annulatus*, se observó un valor promedio de 197 \pm 3,46 preparásitos por día, variando el consumo diario entre 194 y 200 nemátodos durante los tres días de la experiencia.

La densidad de copéodos por litro de agua afectó la prevalencia de *S. spiculatus* en larvas de *A. aegypti* en condiciones de laboratorio (Fig. 20a). Densidades de 50 copéodos por litro redujeron la prevalencia de *S. spiculatus* en un 40% (61.4%) respecto del control (98%). La prevalencia de la infección por *S.*

spiculatus en los recipientes libres de copépodos varió significativamente respecto de los valores obtenidos al utilizar diferentes densidades de copépodos (F:11,12; Gl: 3, 8; $P < 0,0031$). No se observaron diferencias significativas al analizar la prevalencia entre los recipientes con densidades de 5, 10 y 50 copépodos (Tukey $P > 0,05$). El número de nemátodos por larva (intensidad) también disminuyó al incrementarse la densidad de copépodos, siendo 2.8 nemátodos por larva en ausencia de copépodos y 1.4 nemátodos cuando la densidad se incrementó a 50 copépodos por litro (Fig. 20b).

Tabla 18. Depredación de un adulto de copépodo sobre preparásitos juveniles de *Strelkovimermis spiculatus*.

Copépodo	Depredación (%)
<i>Acantocyclops robustus</i>	90% ± 10,0
<i>Argyrodiaptomus bergi</i>	100% ± 0,0
<i>Macrocyclus albidus</i>	70% ± 21,2
<i>Mesocyclops annulatus</i>	100% ± 0,0
<i>Mesocyclops meridiano</i>	100% ± 0,0
<i>Mesocyclops longisetus</i>	80% ± 0,0
<i>Microcyclops sp.</i>	80% ± 0,2
<i>Thermocyclops sp.</i>	97% ± 5,7
<i>Tropocyclops sp.</i>	100% ± 0,0

Fig. 20a. Efecto de la densidad de adultos de *Mesocyclops annulatus* sobre la prevalencia de *Strelkovimermis spiculatus*. Las mismas letras indican que no existen diferencias significativas (Tukey $P > 0,05$).

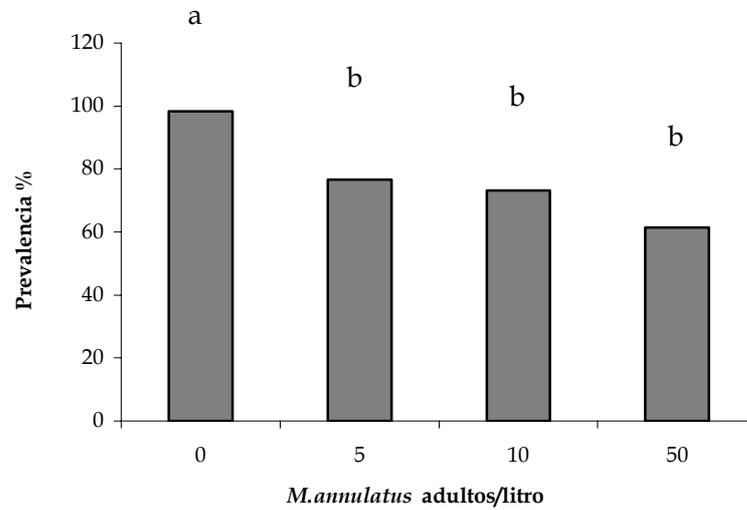
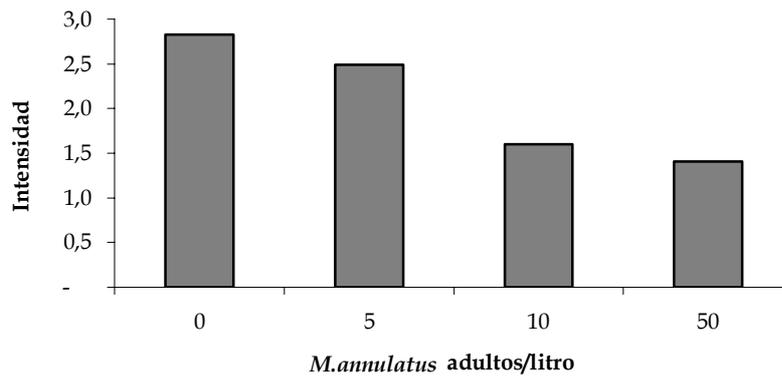


Fig. 20b. Efecto de la densidad de adultos de *Mesocyclops annulatus* sobre la intensidad de *Strelkovimermis spiculatus* en larvas de *A. aegypti*.



8. Espectro de hospedadores culícidos y no culícidos susceptibles a infecciones por *S. spiculatus* en el laboratorio

8.1. Susceptibilidad de hospedadores culícidos a *S. spiculatus* en el laboratorio

Las especies de culícidos susceptibles a *S. spiculatus* al utilizar una dosis de 10 preparásitos por hospedador fueron 13 (Tabla 19). Las larvas de estadios más jóvenes (I y II) fueron más susceptibles al nemátodo, con un promedio de 79,6%, variando entre 12,5 y 100 %. Las larvas de estadios más avanzados (III y IV) mostraron valores de prevalencia de 0 a 100%, con un promedio de 37,8%. Las especies que naturalmente crían en ambientes fitotélmicos (*Isostomyia paranensis* y *Culex renatoi*) o en su equivalente recipiente artificial (*Aedes aegypti*, *Culex pipiens* y *C. apicinus*) fueron muy susceptibles al parasitismo por *S. spiculatus*, ya que estas especies, excepto *C. pipiens*, no conviven en la naturaleza con el parásito. El culícido neotropical *Isostomyia paranensis* fue la especie más susceptible con un porcentaje de parasitismo de 100% en todos los estadios, al utilizar una relación de 10:1 preparásitos por hospedador. El porcentaje de parasitismo en larvas de II estadio de *O. albifasciatus* también fue elevado, obteniéndose 97,5% para la dosis de 10:1 preparásitos por hospedador. Sin embargo la prevalencia disminuyó a 27% en larvas de estadio IV (Tabla 19). En contraposición en larvas de *Anopheles albitarsis*, habitante de ambientes permanentes, se observó un porcentaje de parasitismo muy reducido, aún en el estadio II (12,5%). El número promedio de nemátodos por larva en las diferentes especies de culícidos fue $2,4 \pm 1,9$, aunque se observaron variaciones según la edad de las larvas utilizadas. Las larvas de estadios I y II mostraron una intensidad más elevada ($3,2 \pm 2,3$ nemátodos/larva) y ($1,5 \pm 0,5$ nemátodos/larva) en las larvas de III y IV. No se observó ninguna manifestación de resistencia al nemátodo en las larvas de culícidos utilizadas.

Estos resultados elevan a 23 las especies de culícidos susceptibles a este parásito naturalmente y en condiciones de laboratorio (Tabla 20).

Tabla 19. Susceptibilidad de 14 especies de culícidos al nemátodo *Strelkovimermis spiculatus*.

Especie hospedadora	Estadio	N° Larvas expuestas	% Infección (± DE)	Intensidad (± DE)
<i>Aedes aegypti</i>	I	350	94,28 ± 11,33	2,85 ± 0,95
	II	165	97,14 ± 4,87	1,96 ± 0,67
	III	400	84,12 ± 8,84	2,17 ± 1,07
	IV	600	27,68 ± 8,02	1,14 ± 0,18
<i>Anopheles albitarsis</i>	II	10	12,50 ± 6,25	1,00
	IV	7	0,00	
<i>Culex apicinus</i>	I	75	100,00	4,40 ± 1,12
	II	149	78,77 ± 15,34	2,64 ± 1,89
<i>C. castroi</i>	I	15	70,00	1,25
	II	11	50,00	2,00
	III	5	0,00	
<i>C. chidesteri</i>	II	30	60,00	2,00
<i>C. dolosus</i>	II	58	86,25 ± 7,50	5,01 ± 1,58
<i>C. maxi</i>	IV	8	12,50	1,00
<i>C. pipiens</i>	I	100	95,50 ± 5,25	1,12 ± 0,21
	II	120	85,00 ± 13,78	2,15 ± 1,05
	III	300	67,00 ± 15,13	1,67 ± 0,44
	IV	300	5,60 ± 6,87	1,03 ± 0,05
<i>C. renatoi</i>	II	3	100,00	1,00
	IV	2	100,00	1,00
<i>Isostomyia paranensis</i>	I/II	5	100,00	6,50 ± 3,50
	III/IV	6	100,00	2,50 ± 0,79
<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	II	75	97,50 ± 5,00	3,01 ± 0,60
	IV	75	27,00 ± 5,00	1,30 ± 0,60
<i>O. crinifer</i>	II	105	60,50 ± 7,15	1,59 ± 0,52
	IV	45	2,30 ± 4,04	1,00
<i>Psorophora cyanescens</i>	IV	27	0,00	
<i>P. ferox</i>	I	5	100,00	3,50
	II	90	45,70 ± 5,09	1,34 ± 0,17
	IV	75	3,30 ± 5,70	1,00

Tabla 20. Espectro de hospedadores culícidos del nemátodo *Strelkovimermis spiculatus* (N = infecciones naturales, L = infecciones en el laboratorio).

Hospedador culícido	N	L	Referencias
<i>Aedes albopictus</i>		x	7
<i>A. aegypti</i>		x	*, 7
<i>A. taeniorhynchus</i>		x	7
<i>A. triseriatus</i>		x	7
<i>Anopheles albitarsis</i>		x	*
<i>A. albimanus</i>		x	7
<i>A. quadrimaculatus</i>		x	7
<i>Culex apicinus</i>		x	*
<i>C. castroi</i>		x	*
<i>C. chidesteri</i>	x	x	*
<i>C. dolosus</i>	x	x	*, 36
<i>C. maxi</i>	x	x	*
<i>C. mollis</i>	x		36
<i>C. pipiens</i>	x	x	*, 7, 11, 13, 18, 35
<i>C. renatoi</i>		x	*
<i>C. restuans</i>		x	7
<i>Isostomya paranensis</i>		x	*
<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	x	x	*, 17, 19, 36, 74, 81, 111
<i>O. crinifer</i>	x	x	*, 17, 36, 74
<i>Psorophora ferox</i>		x	*
<i>P. ciliata</i>	x		*
<i>P. cyanescens</i>	x		*
<i>Toxorhynchites rutilus septentrionalis</i>		x	7

* Especies citadas en este estudio.

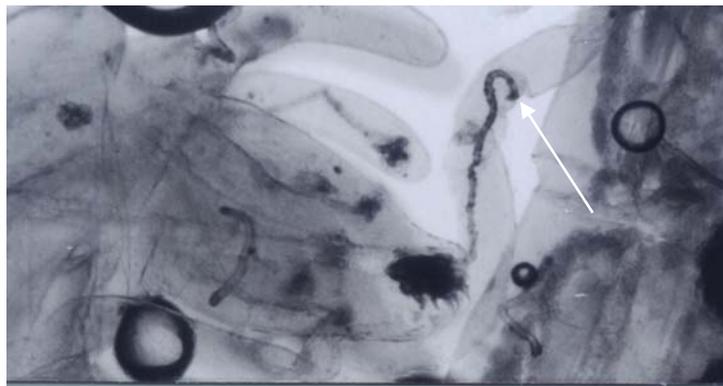
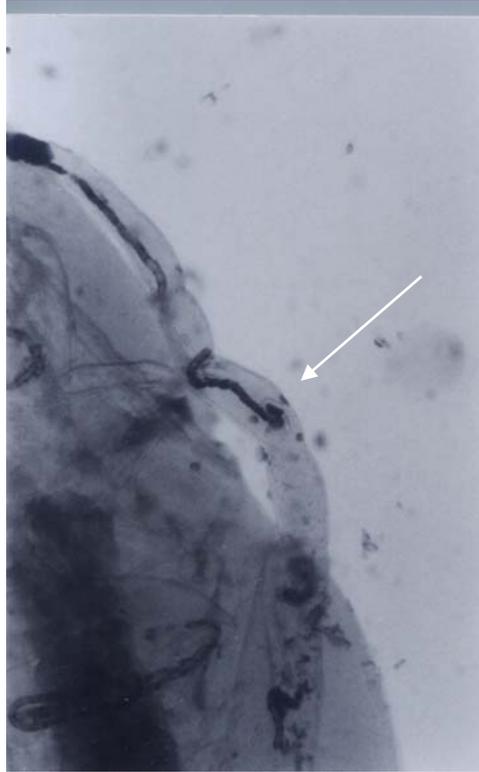
8.2. Susceptibilidad de hospedadores no culícidos a *S.spiculatus* en el laboratorio

Strelkovimermis spiculatus no parasitó a la mayoría de los organismos acuáticos evaluados. La única excepción la constituyeron larvas de dípteros de la familia Chironomidae y Chaoboridae. En la primer familia, se observó la presencia de nemátodos en el 7% de las larvas expuestas a una dosis de 10:1 (P/H) (Tabla 21). Sin embargo al utilizar una relación de preparásitos por hospedador de 500:1 se incrementó el porcentaje de parasitismo a 100%. Los nemátodos que penetraron en las larvas de quironómidos murieron a las 24-48 hs post-infección, debido a la reacción producida por el hospedador que consistió en una melanización de los nemátodos (Fig. 21). Se determinó un parasitismo de 100% en larvas de la familia Chaoboridae, con una dosis de 500:1 preparásitos por hospedador. En estos hospedadores no se registró ninguna evidencia de resistencia en el hospedador, aunque las larvas murieron antes de emerger los juveniles postparásitos.

Tabla 21. Susceptibilidad de organismos no culícidos al nemátodo *Strelkovimermis spiculatus*

Especies hospedadoras	N° expuestos	N° preparasitas/hospedador	Infección (%)
Crustacea			
Cladocera	12	12	0
	120	150	0
	20	500	0
Ostracoda			
O. Podocopida	30	12	0
	10	15	0
	31	30	0
	80	40	0
	160	150	0
	40	500	0
O. Anfipoda	60	50	0
Copepoda			
O. Cyclopoidea			
<i>M.annulatus</i>	30	15	0
	20	100	0
	10	500	0
O. Calanoidea			
<i>Argyrodiaptomus bergi</i>	10	500	0
Insecta			
O. Hemiptera	12	12	0
O. Diptera			
Fam. Chironomidae)			
<i>Chironomus</i> sp.	34	10	7
<i>Chironomus</i> sp.	57	500	100
<i>Chironomus</i> sp.	59	640	100
Fam. Psychodidae	20	10	0
	15	50	0
	11	600	0
Fam. Chaoboridae	3	10	0
	1	1000	100
Odonata			
Zigoptera			
Fam. Coenagrionidae	17	500	0
Anisoptera			
Fam. Libelulidae	1		0
Anelida	15	250	0
Vertebrata			
Pisces			
<i>Cnesterodom decenmaculatus</i>	3	2500	0

Figura 21. Estados preparásitos (L2) del nemátodo *Strelkovimermis spiculatus* melanizados en larvas de quironómidos (ver flecha) (Microscopio óptico 10x)..



9. Introducción de *S. spiculatus* en criaderos naturales de culícidos

9.1. AMBIENTES ARTIFICIALES

SITIO 1:

Introducción de *S. spiculatus* en sitios de cría de *A. aegypti*

Los porcentajes de infección alcanzados al liberar el nemátodo en el sitio denominado 1, en una población natural del culícido *A. aegypti*, tuvieron un valor promedio para estadios mezclados de 89% a las 24 hs postinfección y una intensidad de $3,5 \pm 2,07$, utilizando una dosis de 10:1 preparásitos por hospedador. Las L2 del nemátodo se observaron activas durante 6 días con un valor de infección de $76,5\% \pm 25,6$ y una intensidad de $2,17 \pm 0,9$. Se observaron preparásitos juveniles de *S. spiculatus* vivos en uno de los recipientes a los 60 días posteriores a la liberación. La prevalencia obtenida para la dosis de 20:1 fue $86,6\% \pm 5,7\%$ y una intensidad de $1,75 \pm 0,14$.

SITIO 2:

a) Introducción de *S. spiculatus* en sitios de cría de *A. aegypti*

Cuando los preparásitos de *S. spiculatus* se aplicaron en este sitio, los valores de prevalencia variaron entre 5,5 y 100% (Tabla 22). El mayor porcentaje de infección se obtuvo para una dosis de 100:1 P/H. No se registró parasitismo con la dosis 1:1. La intensidad varió entre 1 y 8 para las diferentes relaciones de preparásitos por hospedador. El mayor número de nemátodos por larva (5,3) se obtuvo con la dosis de 100:1 P/H. Se observó la melanización de las L2 de *S. spiculatus* por parte de las larvas de *A. aegypti* en estadio IV en la dosis de 40:1

(Fig. 22). Las L2 se observaron activas para las dosis de 40 :1 y 300:1 durante 10 días.

b) Introducción de *S. spiculatus* en sitios de cría de *C. apicinus*

Las larvas de *C. apicinus* fueron susceptibles con dosis entre 10:1 y 300:1 preparásitos por hospedador (Tabla 22). La prevalencia varió entre 17 y 90% con las diferentes dosis. Los estadios más jóvenes fueron más susceptibles al nemátodo obteniéndose una prevalencia de 81% en larvas de estadio II y 49% en larvas de estadio IV. El porcentaje de parasitismo fue elevado a partir de una relación de preparásitos por hospedador de 40:1, obteniéndose una prevalencia de 73,8% para estadios mezclados (I, II, III, IV) a 27°C.

La mayor prevalencia (90%) se alcanzó con dosis de 300:1 (P/H). La intensidad varió entre 1 y 2,3. El mayor número de nemátodos por larva (2,3) se obtuvo con la dosis 300:1 a 27°C de temperatura.

Se registraron preparásitos móviles de *S. spiculatus* a los 83 días posteriores a la liberación, en los recipientes en los cuales se aplicó la dosis de 40:1.

c) Introducción de *S. spiculatus* en criaderos naturales de *C. pipiens*

En el sitio denominado 2, en poblaciones naturales de *C. pipiens*, se registraron infecciones con todas las dosis utilizadas. Los porcentajes de infección variaron entre 7 y 54% para las diferentes dosis utilizadas (Tabla 22). La menor prevalencia (7%) se obtuvo con una relación de preparásitos por hospedador de 1:1. La mayor prevalencia para estadios mezclados (54%) se alcanzó con una dosis de 50:1 (P/H). La intensidad varió entre 1 y 2,5. Para la dosis 50:1, se observó que los estadios más jóvenes fueron más susceptibles al nemátodo con una prevalencia de 84% en larvas de estadio II y 17% en larvas estadio IV.

9.2. AMBIENTES PERMANENTES

SITIO 3:

Introducción de *S. spiculatus* en criaderos naturales de *C. pipiens*

Cuando la liberación del nemátodo se realizó en zanjas de desagüe pluvial y domiciliario en la localidad de La Granja, solo en una de las 3 aplicaciones realizadas se determinó infección por *S. spiculatus* (6%) con una dosis de $7,2 \times 10^5$ preparásitos por metro². En las zanjas de la localidad de Romero se observó parasitismo por el nemátodo en una de las dos liberaciones realizadas con un valor de 4% con una dosis de $8,3 \times 10^5$ preparásitos por metro².

9.3. AMBIENTES TEMPORARIOS

SITIO 4

Introducción de *S. spiculatus* en criaderos naturales de *O. crinifer* y *P. ferox*

No se registró infección por *S. spiculatus* al introducir el nemátodo en sitios de cría de los culícidos *O. crinifer* y *P. ferox*.

La densidad de organismos filtradores que se determinaron en estos ambientes en el momento en que se realizaron las liberaciones, varió entre 18 y 64 por litro, donde se determinó que entre 64% y 72% correspondieron a copépodos cyclopoideos, 4% a 11% a cladóceros, 8% a 26% a ostrácodos, 2% a 4% a anfípodos y 2% a 6% a copépodos calanoideos.

Figura 22. Estado preparásito (L2) del nemátodo *Strelkovimermis spiculatus* melanizados en larvas del culícido *Aedes aegypti* (ver flecha) (Microscopio óptico 10x).



Tabla 22. Parasitismo por el nemátodo *S. spiculatus* en estadios mezclados (I-II-III-IV) en un ambiente permanente de culícidos (sitio 2).

Hospedador	N°Preparásitas/Hospedador	Prevalencia (%)	Intensidad	T°
<i>Aedes aegypti</i>	1	0		30°C
	5	5,5	1	30°C
	10	11	1	30°C
	40	92,7 (LII)	2,5	27°C
	60	37,4	1,3	23°C
	100	100	5,3	23°C
	100	32	1,2	34°C
<i>Culex apicinus</i>	1	0		27°C
	5	0		27°C
	10	17 ± 5,5	1	27°C
	40	50	1,8	24°C
	40	74 ± 11,5	2	27°C
	80	15 ± 2,0	1	30°C
	100	70	1,2	21°C
	100	20		28°C
	100	19,2 ± 1,9	1	30°C
	300	78	1,3	24°C
300	90 ± 5,2	2,3	27°C	
<i>Culex pipiens</i>	1	7		22°C
	5	10	1	22°C
	10	20	1	22°C
	50	54	2,5	27°C

10. Efecto de *S. spiculatus* en infecciones bacterianas en *C. pipiens*

10.1. Mortalidad larval por bacteriosis en poblaciones naturales de *C. pipiens*

Larvas de *C. pipiens* infectadas con una bacteria no identificada fueron halladas en la mayoría de las colectas realizadas en las zanjas de desagüe pluvial y domiciliario. Los porcentajes de infección en el campo con la bacteria variaron entre 0,01% y 0,4%. El 100% de las larvas de culícidos infectadas por la bacteria (n=25) murieron en estadio IV. No se registró mortalidad en los controles libres de la bacteria.

10.2. Interacción entre la bacteria y el nemátodo *S. spiculatus*

El porcentaje de infección por la bacteria en las larvas de culícidos expuestas conjuntamente al nemátodo y la bacteria, mostró un valor de 25,0% \pm 8,5% en las larvas de *A. aegypti* y 15,2% \pm 4,6% para las larvas de *C. pipiens* para una relación de 10:1 preparásitos por hospedador. Las larvas infectadas presentaron aspecto blanco lechoso y murieron en estadio IV (Fig. 23). Cuando se expusieron larvas de culícidos con la bacteria en ausencia del nemátodo las infecciones por la bacteria no superaron el 3%. Se observó que entre el 83,3% y 100% de las larvas infectadas por la bacteria estaban infectadas conjuntamente con el nemátodo. Sólo en el 20% de las larvas infectadas conjuntamente por la bacteria y el nemátodo *S. spiculatus* (n=10), liberaron los estados postparásitos. El resto de las larvas hospedadoras murieron sin llegar a liberar el parásito.

Figura 23. Larvas de culícidos parasitadas por bacterias. La flecha indica la larva infectada (Microscopio estereoscópico 10x) .



DISCUSIÓN

El género *Strelkovimermis* incluye diez especies de nemátodos mermítidos que han sido descritos exclusivamente en dípteros de la familia Chironomidae y Culicidae (Johnson & Kleve, 1996). Solamente dos de estas especies, *S. peterseni* (Poinar) y *S. spiculatus*, fueron descritas en hospedadores culícidos. *Strelkovimermis peterseni* fue hallada parasitando larvas de culícidos pertenecientes al género *Anopheles* de la región Neártica, mientras que no se registró infección por este nemátodo en las larvas de *Aedes*, *Culex* y *Psorophora* natural y experimentalmente expuestas (Petersen y Chapman, 1970). *S. spiculatus* por el contrario, fue hallado en la naturaleza parasitando larvas y adultos de varias especies de culícidos neotropicales, las que sumadas a las especies evaluadas en el laboratorio totalizan 23 especies susceptibles incluidas en 7 géneros (Tabla 2).

La mayoría de las especies de culícidos expuestas a *S. spiculatus* en el laboratorio, fueron altamente susceptibles al nemátodo. Sin embargo en las larvas de *Anopheles* el parasitismo fue reducido (12,5%) a diferencia de lo registrado por Becnel y Johnson (1998), quienes obtuvieron 48% de infección. Las diferencias en la susceptibilidad no es bien entendida, pudiendo deberse a características propias de cada especie evaluada, incluso a variaciones en la patogenicidad de los dos aislamientos de *S. spiculatus* utilizados en ambos estudios, uno a partir de larvas de *O. albifasciatus* y otro a partir de larvas de *C. pipiens*. Las larvas de *P. cyanescens* fueron las únicas refractarias a la infección por el nemátodo *S. spiculatus* en el laboratorio. Sin embargo larvas de este culícido parasitadas naturalmente fueron halladas en ambientes temporarios durante este estudio, lo que permitiría considerar que la ausencia de infección podría relacionarse con la exposición al nemátodo del estadio menos susceptible (estadio IV).

Aun cuando el espectro hospedador de *S. spiculatus* es amplio en el laboratorio, el parasitismo en el campo registró variaciones. Niveles epizóóticos

solamente se registraron en poblaciones naturales de *O. albifasciatus* con prevalencias entre 80 y 100%. Estos resultados coinciden con los observados por Maciá *et al.* (1995), Micieli & García (1999) y Campos & Sy (2003), donde los porcentajes de infección por este nemátodo alcanzaron niveles muy elevados. La prevalencia natural de *S. spiculatus* en las otras 5 especies de culícidos en las que se halló en este estudio, *C. chidesteri*, *C. dolosus*, *C. maxi*, *P. ciliata* y *P. cyanescens*, fue notoriamente inferior respecto de lo registrado en larvas de *O. albifasciatus* no superando el 50% (Tabla 1). Esto determina una marcada preferencia del nemátodo por el culícido de las inundaciones coincidiendo con las observaciones de García & Camino (1990); Campos *et al.* (1993); García *et al.* (1994a); Maciá *et al.* (1995). La presencia de *S. spiculatus* en larvas de *C. chidesteri*, *C. maxi*, *P. ciliata* y *P. cyanescens* es mencionada por primera vez en este estudio. La capacidad que se observó en *S. spiculatus* de parasitar naturalmente 5 de las 9 especies de culícidos recolectadas en el campo, inclusive en períodos de ausencia de *O. albifasciatus*, puede constituir una estrategia del nemátodo para permanecer en los ambientes de cría hasta que se produzca una nueva eclosión de este culícido.

Las variaciones observadas en el parasitismo natural de *S. spiculatus* en este estudio podrían deberse a diferentes causas. El nemátodo presentó un sincronismo muy marcado con el ciclo de vida de *O. albifasciatus*. Los huevos del parásito y del hospedador eclosionaron simultáneamente al inundarse los criaderos permitiendo alcanzar elevadas densidades del culícido y del nemátodo. Esto facilitaría el encuentro entre ambos y justificaría los elevados porcentajes de infección en larvas de *O. albifasciatus*. Por el contrario los culícidos *O. crinifer* y *P. ferox*, se desarrollaron en ambientes temporarios sometidos a inundaciones frecuentes, inclusive una o más por semana, debido a las fluctuaciones del nivel del Río de La Plata. Estos criaderos no soportaron períodos de sequía superiores a 4 semanas como requiere el ciclo de vida de *S. spiculatus*, por lo que el comportamiento del nemátodo se asemejaría a lo observado en este estudio, en aquellos cultivos que permanecieron inundados permanentemente. En consecuencia al no existir un sincronismo en la eclosión

hospedador y parásito, se producirían emersiones continuas en bajo número de las L2, ocasionando niveles de infección muy inferiores a los observados en *O. albifasciatus*. Situaciones similares tienen lugar en los sitios de cría de inundaciones permanentes como son las zanjas de desagüe pluvio-domiciliario, en los que habita el culícido *C. pipiens* y los ambientes en los que se desarrollan otras especies de *Culex* y *Anopheles*. En estos sitios de cría, la eclosión de los huevos de los culícidos también es asincrónica, provocando la superposición de todos los estadios larvales, cuya susceptibilidad diferencial podría reducir los niveles de parasitismo. El efecto que tiene la calidad del agua de los criaderos sobre la viabilidad de las L2 del nemátodo, también podría reducir los niveles de parasitismo por *S. spiculatus* en el campo.

La diferencia en la susceptibilidad alcanzada en las especies de culícidos puede deberse a características fisiológicas, físicas y/o de comportamiento, tal como la habilidad de algunas especies de culícidos para liberarse del ataque de los estados preparásitos (Petersen, 1979; Petersen & Chapman, 1979). El comportamiento que tienen las diferentes especies de culícidos para alimentarse, su distribución en los criaderos, la forma de moverse, facilitarían o no el encuentro con el parásito. La profundización del conocimiento de la biología de los culícidos hospedadores, sería necesario para poder interpretar con mayor precisión esta relación hospedador-parásito.

Kerwin *et al.* (1990) trabajando con *R. culicivorax*, demostraron que los componentes de la cutícula de los culícidos afectan la susceptibilidad al nemátodo; la mayor o menor rigidez de la cutícula de los culícidos, podría impedir o facilitar la entrada del nemátodo. Por otra parte, la presencia de determinado tipo de glicoproteína, presente en el hospedador y en el parásito, sería responsable de la atracción entre ambos. La composición y estructura de la cutícula de *S. spiculatus* no ha sido investigada hasta el presente.

La mayoría de los organismos acuáticos expuestos a los preparásitos del nemátodo no fueron susceptibles. En ninguno de los hospedadores no culícidos en los que *S. spiculatus* logró penetrar (quironómidos y caobóridos) se observó el desarrollo del nemátodo. Estudios previos realizados por Becnel & Johnson

(1998), sobre hospedadores no culícidos de *S. spiculatus*, demostraron la escasa susceptibilidad de esta fauna, inclusive para las larvas de quironómidos, en concordancia con este estudio. Las L2 de *R. culicivora* penetraron un número más elevado de organismos (simúlidos, caobóridos, quironómidos y coleópteros), sin embargo, en ninguno de los casos completaron su desarrollo (Ignoffo *et al.* 1973). Los autores mencionan la melanización de los estados preparásitos del nemátodo en las larvas de quironómidos tal como se observó en este estudio.

Además de las diferencias en la susceptibilidad y el parasitismo de los hospedadores culícidos, los factores ambientales también pueden afectar la eficacia de parásitos y patógenos e influir en el inicio y desarrollo de epizootias naturales de los respectivos ambientes. Por tal motivo el efecto de los factores bióticos y abióticos sobre la viabilidad y la prevalencia de *S. spiculatus*, se estudió previo a la introducción del nemátodo en condiciones naturales.

Entre los factores evaluados, se observó que la temperatura afectó la longevidad de los estados preparásitos de *S. spiculatus*. Los preparásitos expuestos a temperaturas entre 4 y 27°C conservaron la movilidad entre 35 y 27 días posteriores a su eclosión, respectivamente. Entre el 9 y 33% de los preparásitos presentaron movilidad luego de expuestos a las 4 temperaturas durante 10 días. Estos datos coinciden con los resultados de Micieli & García (1999) sobre una población natural de *S. spiculatus* en criaderos de *O. albifasciatus*, en la que recolectaron L2 del nemátodo libres y móviles durante períodos superiores a los 7 días posteriores a la inundación de los ambientes, incrementándose la longevidad de las L2 en los meses con temperaturas bajas. Estos datos difieren de los resultados aportados por Camino & Reboredo (1994) que determinaron que los preparásitos de *S. spiculatus* mantenidos en condiciones de laboratorio y a temperatura de 20°C fueron viables 24 hs, mientras que los preparásitos que no penetraron en las larvas de los culícidos murieron entre las 30 y 48 hs. La movilidad de los preparásitos de *R. culicivora* decreció más rápidamente a temperaturas elevadas, variando entre 2 días a 37°C y 6 días entre 1 y 12°C (Brown & Platzer, 1977).

Camino & Reboredo (1994), hallaron que los preparásitos de *S. spiculatus* fueron infectivos exclusivamente durante las 24 hs post-eclosión, mientras que los resultados obtenidos en este trabajo, señalan porcentajes de parasitismo superiores a 70%, durante todo el período en que los nemátodos permanecieron móviles en las cuatro temperaturas a que fueron expuestos.

Romanomermis culicivorax produjo porcentajes de parasitismo más elevados a temperaturas entre 21 y 33°C que a temperaturas menores (12-18°C), aunque el parasitismo disminuyó más rápido a temperaturas mayores que a menores (Brown & Platzer 1977). Petersen (1975), en un estudio sobre la variación del parasitismo de *R. culicivorax* a temperaturas entre 24 y 27°C comprobó que el porcentaje de parasitismo en larvas de *C. pipiens* declinó rápidamente luego de 24 hs siendo casi nulo a las 72 hs.

Otro de los factores estudiados fue el agua de los criaderos, donde se determinó que el agua de las zanjas de desagüe pluvio-domiciliario, afectó la viabilidad y la infectividad de los estados preparásitos del nemátodo. Los porcentajes de parasitismo en larvas de *A. aegypti* y *C. pipiens* expuestas al nemátodo, disminuyeron en agua de zanja entre 86 y 75% respecto de los controles en agua de clorinada.

Los resultados obtenidos al analizar el agua proveniente de los criaderos, evidenciaron el alto nivel de los iones fósforo y amonio en las zanjas de desagüe pluvio-domiciliario. Los valores elevados de fósforo y el alto contenido de amonio (superior a los 0,5 mg/l) permitieron considerar a las aguas provenientes de las zanjas como químicamente contaminadas. El alto contenido de fósforo puede disminuir la absorción de oxígeno atmosférico debido a la formación de una película superficial. La presencia de este ion, depende generalmente del aporte de detergentes provenientes de los desagües domiciliarios. Las concentraciones de amonio indicaron la presencia de elevada cantidad de materia orgánica y contaminación fecal (Winkler, 1994). El efecto de la concentración de amonio y fósforo, sobre la viabilidad de las L2, se estudió en el laboratorio y se determinó que para una dosis de 3 mg N/l, la prevalencia de *S. spiculatus* disminuyó a 76%, siendo 94% en los controles. Sin

embargo cuando la concentración se elevó a 4 mg de N/l, el parasitismo se redujo considerablemente a 3%, registrándose una importante mortalidad de los estados preparásitos (datos no publicados). La presencia de ciertos iones como el fósforo provocó altos niveles de toxicidad para el mermítido *R. culicivora* (Brown & Platzer 1977). Si bien hasta el momento no se determinó este efecto sobre el nemátodo *S. spiculatus*, resultados similares podrían esperarse. En consecuencia la calidad del agua de los criaderos puede reducir significativamente los porcentajes de infección por el nemátodo, lo que debería tenerse en cuenta en el momento de introducirlo en los ambientes naturales. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Petersen (1979), quien determinó que *C. pipiens quinquefaciatus* mostró ser un excelente hospedador de *R. culicivora* en el laboratorio, pero al ser introducido en ambientes con exceso de materia orgánica registró importantes reducciones en el parasitismo. *Aedes taeniorhynchus* y *A. sollicitans*, especies de aguas salobres, también mostraron ser excelentes hospedadores en el laboratorio pero no en condiciones naturales. La salinidad también puede interferir en el parasitismo por *S. spiculatus*, aunque se ha demostrado que tolera hasta 7 mg/l de ClNa (Camino & García, 1991).

Entre los factores bióticos, podemos mencionar la presencia de depredadores que habitan en los ambientes temporarios donde se localiza el sistema *S. spiculatus* - *O. albifasciatus*, tales como coleópteros (dytiscidos y larvas de hydrophilidos), larvas de otros culícidos, copépodos, etc (Campos *et al.*, 2004). Los copépodos cyclopoideos tienen la capacidad de tolerar la desecación del ambiente. Por tal motivo se estudió la capacidad depredadora de las especies de copépodos presentes en estos ambientes, sobre los estados preparásitos de *S. spiculatus*, habiéndose determinado que las 9 especies de copépodos evaluadas consumieron las L2 del nemátodo. *Mesocyclops annulatus*, en general, constituye la especie de copépodos más abundante y frecuente en este tipo de ambientes, en la Provincia de Buenos Aires (Micieli *et al.*, 2002). Además, *M. annulatus* puede tolerar la desecación de los ambientes, habiéndose observado adultos a las 24 hs de inundado el ambiente (Micieli *et al.*, 2001). Por

tales motivos se profundizó el conocimiento de la capacidad depredadora de esta especie y se determinó que los adultos de ambos sexos y los juveniles, resultaron eficientes depredadores de preparásitos del nemátodo. La densidad de copépodos afectó la prevalencia de *S. spiculatus*, densidades superiores a 10 ejemplares de *M. annulatus* por litro redujeron sensiblemente los niveles de parasitismo de *S. spiculatus*.

La depredación del copépodo *Cyclops vernalis* sobre las L2 del mermítido *R. culicivora* en condiciones de laboratorio, también afectó el parasitismo por el nemátodo (Platzer & Mackenzie - Graham, 1980). Estos autores hallaron que una densidad de 20 copépodos adultos por litro produjo una significativa reducción del parasitismo en larvas de *C. pipiens* y 53 copépodos por litro redujo la prevalencia de *R. culicivora* a 50%.

Mieli *et al.* (2001), en un estudio sobre la epizootiología del microsporidio *Amblyospora albifasciati* en su hospedador definitivo, *O. albifasciatus* y en el hospedador intermediario, *M. annulatus*, aportó la única información existente sobre la densidad natural del copépodo. Los autores hallaron valores máximos entre 30 y 40 hembras adultas de *M. annulatus* en 100 cucharones de 300 ml aunque no mencionaron datos sobre la densidad de machos y juveniles. Si nos referimos a la presencia de este copépodo en los ambientes donde se desarrolla el sistema *O. albifasciatus* - *S. spiculatus* en la Provincia de Buenos Aires, es común encontrar densidades entre 2 y 20 hembras por litro (Mieli com. pers.).

Conjuntamente con el estudio de los factores bióticos y abióticos que pudiesen afectar el parasitismo natural de *S. spiculatus*, se llevó a cabo la producción masiva del nemátodo en el laboratorio con la finalidad de producir suficiente cantidad de estados preparásitos para su posterior evaluación en condiciones naturales. Este constituye uno de los factores limitantes más importantes en la utilización de los mermítidos como agentes de control biológico (Petersen, 1985). Respecto a la producción masiva, se evaluaron dos especies de culícidos como hospedadores para la cría del nemátodo. Los resultados obtenidos al analizar las 4 dosis de L2 de *S. spiculatus* por

hospedador mostraron que no existen diferencias significativas en la prevalencia e intensidad entre las dosis para ambos culícidos hospedadores utilizados, *A. aegypti* y *C. pipiens*. Sin embargo al aumentar la dosis, la prevalencia e intensidad no varió significativamente, pero disminuyó el porcentaje de nemátodos que lograron parasitar y emerger de las larvas de culícidos como L4 (eficiencia). Por tal motivo, se considera que una dosis entre 3:1 y 8:1, es una relación adecuada para producir altos valores de parasitismo y una mayor eficiencia, en los culícidos *Aedes aegypti* y *Culex pipiens* en el laboratorio. Estos resultados difieren de lo observado por Rodríguez *et al.*, (2003), quienes trabajando con este nemátodo en larvas de *C. quinquefasciatus* obtuvieron diferencias significativas entre una dosis de 3:1 y 7:1 L2/hospedador.

El mermítido *R. culicivora* en larvas del culícido *C. p. quinquefasciatus*, produjo un parasitismo de 88% en infecciones en el laboratorio, con una dosis de 15:1 L2/hospedador (Petersen, 1978). Por lo tanto el nemátodo *S. spiculatus*, presentó la ventaja respecto a *R. culicivora* de producir altos porcentajes de infección con un menor número de juveniles preparásitos por hospedador.

Debido a la facilidad de cría del culícido *A. aegypti* en el laboratorio y la imposibilidad de criar la especie más susceptible *O. albifasciatus*, se considera al culícido *A. aegypti* el más adecuado para el mantenimiento de *S. spiculatus*. Por otra parte esta especie y otros géneros que habitan ambientes sometidos a períodos de desecación, tienen la ventaja de completar el desarrollo larval más rápidamente que otras especies de culícidos (Service, 1993).

Los estadios más jóvenes (I-II) fueron más susceptibles al nemátodo. Debido a la elevada susceptibilidad registrada y a la mortalidad levemente inferior a la observada en las larvas expuestas al nemátodo en estadio I, se considera que el estadio II es el más adecuado para realizar las infecciones en el laboratorio. Los resultados coinciden con los observados por Petersen (1981), que determinó en larvas de *C. pipiens* expuestas a *R. culicivora*, una prevalencia entre 95 y 22%, con una dosis de 10:1 L2/hospedador, siendo las larvas de estadio II las más susceptibles.

Camino & Reboredo (2000), trabajando con larvas de *C. pipiens* y *S. spiculatus*, determinaron con una relación de 12:1 L2/hospedador, un parasitismo mayor en las larvas de estadio IV (38%) que el registrado en este estudio. Las diferencias registradas con este trabajo, podrían deberse a la menor dosis utilizada y a que las larvas puedan haberse infectado en estadio IV avanzado.

Respecto a la producción masiva de L4 de *S. spiculatus*, la mayor eficiencia (32%) se obtuvo con la dosis de 1:1 L2/hospedador. Cuando la dosis se aumentó a 10:1 L2/hospedador, la eficiencia disminuyó a 10%. Sin embargo, la obtención de un número más elevado de L4 (3,5 gramos) justifica la utilización de esta dosis más elevada, ya que permite disminuir los costos en el mantenimiento de la colonia del nemátodo. De lo contrario utilizando una dosis de 1:1 L2/hospedador, para obtener la misma producción de L4 que la alcanzada con la dosis de 10:1 L2/hospedador, necesitaría infectar el triple de larvas de culícidos (Tabla 6).

Los niveles elevados de infección por mermítidos pueden favorecer el parasitismo múltiple, incrementando el número de machos y disminuyendo potencialmente la producción de L2 (Petersen, 1972; Camino, 1988; Camino & Reboredo, 1994). La utilización de la dosis 10:1 L2/hospedador, mostró un leve incremento en la producción de machos, lo que debería tenerse en cuenta ya que podría interferir en la producción de estados preparásitos.

Por lo tanto una dosis de 4:1 L2/hospedador constituye una dosis adecuada para la producción masiva de juveniles postparásitos de *S. spiculatus* en el laboratorio, ya que produce un alto valor de infección (81%) resultando en una producción de L4 más elevada y una adecuada relación de sexos, que no afectaría la producción de los preparásitos. Por otra parte con esta dosis se obtuvo una eficiencia elevada respecto a otras dosis (16%).

El mayor número de L2 de *S. spiculatus* en los cultivos expuestos a inundaciones semanales, se registró siempre en las primeras inundaciones, coincidiendo con observado por Petersen (1978) para *R. culicivora*. Sin embargo los resultados difieren en el tiempo necesario de almacenamiento de los

cultivos, para obtener la mayor producción de L2. La mayor eclosión de L2 de *R. culicivora* se obtuvo cuando los cultivos se inundaron por primera vez, entre la semana 11 y 19, declinando la producción con las sucesivas inundaciones y no registrándose eclosión luego de la semana 36 (Petersen, 1978). Por el contrario Critchfield & Boyce (1985), determinaron la menor producción de juveniles preparásitos a la semana 11 y la máxima producción a las semanas 15, 18 y 23. A diferencia de *R. culicivora*, se determinó en este estudio, que la mayor producción de L2 de *S. spiculatus*, se obtuvo al inundar los cultivos luego de transcurrir 5 semanas de almacenados. Estos resultados difieren de los aportados por Camino & Reboledo (1996), para la producción de *S. spiculatus*, donde el máximo número de L2 se alcanzó al inundar los recipientes a los 3 meses de almacenados.

La producción total de L2 del nemátodo en los cultivos inundados semanalmente, mostró valores entre 0,2 y $1,2 \times 10^6$ para las distintas relaciones de sexos. El máximo número de preparásitos ($1,2 \times 10^6$) se obtuvo al utilizar una relación de sexos de 1♀:1,5♂.

El número de L2 obtenidos al inundar los cultivos de *R. culicivora*, varió entre 0,1 y 1×10^7 a partir de enterrar entre 10 y 12 gramos de estados postparásitos (Petersen & Willis 1972a) y entre 0,08 y $3,6 \times 10^6$ (Critchfield & Boyce, 1985).

Si consideramos que los valores de producción de L2 registrados por Petersen & Willis (1972a), utilizando el nemátodo *R. culicivora* (0,1 a 1×10^7), se obtuvieron a partir de 10 a 15 gramos de L4 por cultivo y los obtenidos por Camino & Reboledo (1996) con el nemátodo *S. spiculatus* (0,7 a 1×10^6 L2) a partir de una densidad de postparásitos de 22 por cm^2 (aproximadamente 3 gramos de nemátodos por cultivo), los resultados registrados en este estudio mostraron valores más elevados en la producción de L2 de *S. spiculatus* (0,2 a $1,2 \times 10^6$) a partir de 1 gramo de estados postparásitos.

El número de L4 registrados en cada infección con *R. culicivora*, fue levemente superior, obteniéndose 8,8 gramos, con una relación de 12:1 L2/hospedador, utilizando 20.000 larvas de culícidos (Petersen, 1978), siendo

3,5 gramos en las infecciones con *S. spiculatus* a partir de 10.000 larvas y una relación de 10:1 L2/hospedador.

La variación en el número de L2 de *S.spiculatus* producidas en los cultivos inundados semanalmente, podría estar relacionado principalmente con la humedad retenida por los cultivos. La mortalidad prematura de las larvas en las bandejas de cría debida a la calidad de agua, alimentación inapropiada y parasitismo múltiple y/o a la presencia de agentes contaminantes también pueden afectar la producción de L2 (Petersen, 1978).

Otro de los factores que podría afectar la producción de L2 en los cultivos y debería evaluarse, es la presencia de las dos especies de hongos patógenos que se hallaron atacando las L4 y adultos del nemátodo. Existe un amplio espectro de hongos que atacan nemátodos, constituyendo una amenaza para los sistemas de cría, ya que pueden llegar a destruir colonias enteras (Poinar, 1979). El hongo *Catenaria anguillulae* fue citado sobre huevos, juveniles y adultos del nemátodo *R. culicivora* provocando una importante disminución en la eclosión de los estados preparásitos (Stirling & Platzer, 1978). El agregado de ácido acético a las bandejas de cría de las larvas expuestas al nemátodo, disminuyó la contaminación por *C. anguillulae* de las L4 del nemátodo *R. culicivora* emergidas. Sin embargo la disminución brusca del pH, afectó los diferentes estadios del nemátodo y consecuentemente la producción de L2 en los cultivos (Platzer & Stirling, 1971).

La presencia de los hongos pertenecientes a los géneros *Myzocytiopsis* y *Catenaria* sobre las L4 de *S. spiculatus*, se observó entre las 48 a 72hs a partir de la emersión de los nemátodos de los hospedadores. Por tal motivo, es importante eliminar aquellos nemátodos que no se hayan enterrado en los recipientes de cría durante las primeras 24 a 48 hs a efectos de disminuir la contaminación de los cultivos.

A diferencia de lo registrado en la producción de L2 de *S. spiculatus* en cultivos inundados semanalmente, cuando estos fueron sometidos a inundaciones permanentes, se observó una importante disminución en la producción, debida a la eclosión no simultánea de los huevos del nemátodo,

con valores inferiores a $5,0 \times 10^4$. La eclosión no sincrónica o continua de los huevos del nemátodo en ambientes permanentes impediría la presencia de elevados valores de L2, resultando en prevalencias bajas y tal vez dificultando el establecimiento del nemátodo en estos sitios de cría como se mencionó anteriormente.

Los preparásitos juveniles eclosionados en cultivos inundados semanal y permanentemente, conservaron en todo momento la capacidad de infectar, constituyendo un atributo positivo si se desea utilizar *S. spiculatus* como agente de control biológico de culícidos.

Una vez que se logró producir masivamente el nemátodo *S. spiculatus* en el laboratorio, se llevaron a cabo los primeros ensayos preliminares donde se liberó el nemátodo en ambientes naturales de culícidos.

Los mermítidos son utilizados como agentes de control biológico contra culícidos, entre ellos la mayoría de los ensayos se han llevado a cabo con el nemátodo *R. culicivora*. Petersen y Willis (1972b), lo aplicaron en ambientes permanentes y semipermanentes, para controlar larvas de *Anopheles albimanus*, en un área entre 200 y 3000 m². Los autores determinaron valores de parasitismo de hasta 100%. El nemátodo logró establecerse en 7 de los 11 sitios tratados. El mayor valor de parasitismo (64%), se obtuvo en estadios mezclados al utilizar una dosis entre 751 y 1000 L2/m². Posteriormente se introdujo en otros criaderos de *Anopheles* y *Psorophora* obteniéndose valores de prevalencia que variaron entre 6 y 85% (Petersen & Willis, 1972b; 1974; 1975; 1976; Zaim *et al.*, 1988), aunque las larvas de *Culex tarsalis* no fueron susceptibles al nemátodo (Petersen *et al.*, 1978). El nemátodo logró establecerse en los sitios de cría pero no se registró una importante reducción de la población de anophelinos (Zaim *et al.*, 1988).

Santamarina *et al.* (1996) determinaron al aplicar el nemátodo *R. culicivora* en un mismo sitio de cría, que las larvas de *Anopheles* mostraron una susceptibilidad más elevada respecto a las pertenecientes al género *Culex*. Por otra parte la utilización del mermítido, *R. iyengari*, también produjo elevados

porcentajes de parasitismo en larvas de *Anopheles*, provocando una reducción de la densidad larval entre 85 y 97% (Santamarina & Bellini, 2000).

Cuando se introdujo el nemátodo *S. spiculatus* en ambientes de culícidos, se observó que fue capaz de infectar en poblaciones naturales de *A. aegypti*, *C. apicinus* y *C. pipiens*. Los resultados obtenidos al aplicar el nemátodo en una población de *A. aegypti* en ambientes artificiales, provocó elevados porcentajes de parasitismo con la dosis 10:1 L2/hospedador, en concordancia con los datos observados por Santamarina Mijares & Perez Pacheco (1998) en el mismo hospedador, pero utilizando el nemátodo *R. iyengari*. Las diferencias observadas en los valores de infección entre el sitio 1 y 2 para la dosis de 10 preparásitos por larva en *Aedes aegypti*, podrían deberse al mayor contacto entre el hospedador y el parásito, debido al tamaño más reducido del primer ambiente. En el sitio 2, dosis entre 40:1 y 300:1 provocaron altos niveles de infección en las tres especies de culícidos evaluadas, a temperaturas entre 21 y 27°C. Las larvas de *C. apicinus* fueron las más susceptibles donde se registró un parasitismo elevado (73,8%) para estadios mezclados, con una dosis de 40:1 L2/hospedador a 27°C. Las larvas de culícidos en estos ambientes se observaron parasitadas por el nemátodo aproximadamente durante 10 días. Estos datos coinciden con los aportados por Micieli & García (1999), que observaron L2 de *S. spiculatus* vivas por más de 7 días.

Estos resultados preliminares son auspiciosos e inducen a continuar evaluando diferentes dosis de L2/hospedador que permitan extender la actividad parasitaria de *S. spiculatus* en estos ambientes, de manera de aumentar los porcentajes de infección y en consecuencia la mortalidad larval, disminuyendo las poblaciones de los culícidos.

Los bajos valores de parasitismo hallados luego de la liberación de *S. spiculatus* en las zanjas de desagües domiciliarios y pluviales, podrían deberse al efecto de la calidad de agua, tal como se determinó en este estudio y que afectó la viabilidad e infectividad de las L2 del nemátodo.

La ausencia de parasitismo en sitios de cría de *O. crinifer* y *P. ferox*, podría deberse a las características de este tipo de ambiente, el cual está sometido a

fluctuaciones continuas en el nivel de agua debido a las crecidas del río, pudiendo provocar la eliminación de las L2 del ambiente. Otra de las posibles causas podría ser la acción de depredadores sobre las L2, cuyo efecto se determinó en este trabajo. Además de la presencia de copépodos en estos criaderos, los cuales constituyeron un importante agente depredador de L2, es común encontrar una variedad de organismos filtradores tales como los registrados en este estudio (ostrácodos, anfípodos, cladóceros) los cuales podrían tener un efecto importante en la reducción del número de L2 en los ambientes. Este estudio está en concordancia con Petersen (1976), quién atribuyó el reducido parasitismo registrado cuando se aplicó *R. culicivora* en poblaciones de *C. p. fatigans*, a las bajas temperaturas, la depredación del ostrácodo *Cyprinotus dentatis* y la excesiva contaminación de los criaderos.

Uno de los resultados derivados del uso de *S. spiculatus* en criaderos de *C. pipiens* fue el incremento de infecciones bacterianas en las larvas de estos culícidos. La identificación taxonómica de esta bacteria se está realizando en la Fundación de Investigaciones Biológicas Aplicadas, FIBA, Mar del Plata. Los resultados obtenidos en el campo y confirmados en ensayos en el laboratorio, nos aportan información sobre el modo de transmisión de esta bacteria. La existencia de mecanismos que lesionen el tegumento de las larvas y faciliten el ingreso de la bacteria al hemocele, explica la baja prevalencia de esta infección en poblaciones naturales de *C. pipiens* (<0,5%) y el incremento de esta, en las infecciones en el laboratorio en presencia de *S. spiculatus*. Este hallazgo abre un interesante campo referido a la complementación del uso de dos o más parásitos y patógenos en programas de control de insectos perjudiciales.

El espectro amplio de culícidos susceptibles a *S. spiculatus*, la facilidad para producirlo a mayor escala y la capacidad de este mermítido para producir epizootias naturales, constituyen características sobresalientes que lo presentan como un agente interesante para el control biológico de culícidos.

Este estudio constituye la primera evaluación a campo de este parásito, como bioregulador de culícidos. Los primeros resultados son alentadores y señalan claramente la necesidad de conocer con anterioridad, el ambiente y la

especie a tratar, para posteriormente determinar la dosis de L2 y el momento adecuado para ser aplicadas.

Finalmente, los estudios sobre las aplicaciones de *S. spiculatus* en criaderos de culícidos no son concluyentes, ni definitivos por lo que deberían continuarse y profundizarse las evaluaciones a campo, en diferentes ambientes y sobre diversas especies de culícidos. Paralelamente otros estudios de gran importancia que deberían abordarse son la producción “*in vitro*” de mermítidos, problema básico para el futuro en el control biológico de los miembros de esta familia de nemátodos y toda la referido al almacenamiento y tecnología de aplicación de *S. spiculatus*.

CONCLUSIONES

El nemátodo *S. spiculatus* es un importante agente para controlar poblaciones de culícidos debido a que responde a los postulados modificados de Koch (Poinar, 1979) :

- Es específico para culícidos, no constituyendo una amenaza para la fauna que habita los criaderos.
- Es capaz de parasitar con altos valores de prevalencia poblaciones de *A. aegypti*, *C. apicinus* y *C. pipiens*.
- Se puede producir fácilmente en el laboratorio, en las dos especies de culícidos evaluadas *A. aegypti* y *C. pipiens*, obteniéndose valores de parasitismo elevados para tres de los cuatro estadios larvales de sus hospedadores.
- Presenta la ventaja en la producción masiva respecto a *R. culicivora* de producir altos niveles de infección a partir de dosis inferiores.
- La longevidad prolongada acompañada por la conservación de la capacidad infectiva de los preparásitos de este mermítido indican que *S. spiculatus* sería un agente efectivo para el control de un número importante de especies a temperaturas entre 4 y 27°C.

Sin embargo debería tenerse en cuenta en su utilización como agente de control las siguientes limitaciones:

- Posee una mayor especificidad en el campo para *O. albifasciatus*, lo que podría interferir con su aplicación para otras especies de culícidos.
- La calidad de agua de los criaderos afectó la viabilidad e infectividad de los preparásitos lo que hace que este nemátodo no sea aplicable en algunos ambientes, tales como zanjas contaminadas.
- Los cultivos son susceptibles al ataque de hongos patógenos.

BIBLIOGRAFÍA

1. ADAMS, J. R. 1991. Introduction and classification of viruses of invertebrates. *En: Adams, J. R. & J. R. Bonani (eds.), Atlas of invertebrate viruses, CRC Press* pp. 1-8.
2. ANDERSON, J. F. 1970. An iridescent virus infecting the mosquito *Aedes stimulans*. *Journal of Invertebrate Pathology* 15 :219-224.
3. AVILÉS, G., G. RANGEÓN, V. VORNDAM, A. BRIONES, P. BARONI, D. ENRIA, MS. SABATTINI. 1999. Dengue reemergence in Argentina. *Emerging Infect Diseases* 5: 575-578.
4. BARCAT, J. A., R. ISIDORO, H. S. ALUME. 1999. Dirofilariasis pulmonar. *Medicina (Buenos Aires)* 59: 218.
5. BAY, E. C. 1985. Other larvivorous fishes. *En: Chapman, H (ed.), Biological Control of mosquitoes, Bulletin 6, American Mosquito Control Association, California, pp. 18-24.*
6. BECNEL, J. J. & G. T. ANDREADIS. 1999. Microsporidia in insects. *En: Wittner & Weiss (eds.), The Microsporidia and Microsporidiosis, ASM Press, Whashington, pp. 447-501.*
7. BECNEL, J. J. & M. A. JOHNSON. 1998. Pathogenicity test on nine mosquito species and several non-target organisms with *Strelkovimermis spiculatus* (Nemata: Mermithidae). *Journal of Nematology* 30: 411-414.
8. BENENSON, A.S. 1995. Control of communicable diseases manual, 16 th. American Public Health Association.

9. BROWN, B. J. & E. G. PLATZER. 1977. The effect of temperature on the infectivity of *Romanomermis culicivorax*. *Journal of Nematology* 9: 166-172.
10. CABALLER, B., N. PÉREZ, B. ELSNER, H. ESTEVA & E. EYHEREMENDI. 1994. Dirofilariasis pulmonar: presentación de dos casos. *Revista Argentina de Cirugía* 67: 172-174.
11. CAMINO, N. B. 1988. Efecto del parasitismo múltiple en la determinación del sexo de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae) en larvas de *Culex pipiens fatigans* Wiedemann, 1828. *Iheringia, Serie Miscelánea* 2: 93-97.
12. CAMINO, N. B. 1989. Primer registro de culícidos (Diptera: Culicidae) parasitados por *Hydromermis* sp. (Nematoda: Mermithidae). *Neotrópica* 35: 67-70.
13. CAMINO, N.B. & J.J. GARCÍA. 1988. Crecimiento larval de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda. Mermithidae) en *Culex pipiens fatigans* Wiedeman, 1828, como hospedador alternativo. *Iheringia, Serie Miscelánea* 2: 93-97.
14. CAMINO, N. B. & J.J. GARCÍA. 1991. Influencia de la salinidad y el pH en el parasitismo de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae) en larvas de *Culex pipiens* Wied. (Diptera: Culicidae). *Neotrópica* 37: 107-112.
15. CAMINO, N. B. & G. R. REBOREDO. 1994. Biología de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae) parásito de mosquitos (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. *Neotrópica* 40: 45-48.

16. CAMINO, N. B. & G. R. REBOREDO. 1996. Producción de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae). *Neotrópica* 42: 47-50.
17. CAMINO, N. B. & G. R. REBOREDO. 2000. Efecto de la temperatura en la infección de tres especies de Culicidae (Diptera) por *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae). *Iheringia, Série Zoologia* 88: 3-6.
18. CAMPOS, R. E., A. MACIÁ & J. J. GARCÍA. 1993. Fluctuaciones estacionales de culícidos (Diptera) y sus enemigos naturales en zonas urbanas de los alrededores de La Plata, Provincia de Buenos Aires. *Neotrópica* 39: 55-66.
19. CAMPOS, R. E. & V. E. SY. 2003. Mortality in immatures of the floodwater mosquito *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) and effects of parasitism by *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) in Buenos Aires province, Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (2): 199-208.
20. CAMPOS, R. E., L.A. FERNÁNDEZ & V. E. SY. 2004. Study of the insects associated with the floodwater mosquito *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) and their possible predators in Buenos Aires Province, Argentina. *Hydrobiologia* 524: 91-102.
21. CHAPMAN, H. C. 1985. *Biological Control of Mosquitoes*. American Mosquito Control Association, Bulletin n°6, California.
22. CLARK, T. B. & D. G. BRANDL. 1976. Observations on the infection of *Aedes sierrensis* by a tetrahymenid ciliate. *Journal of Invertebrate Pathology* 23: 341-349.
23. CORLISS, J. O. & D. W. COATS. 1976. A new cuticular cyst-producing

- tetrahymenid ciliate, *Lambornella clarkin* sp, and the current status of ciliatosis in culicine mosquitoes. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 95: 725-739.
24. COUCH, J. N & C. E. BLAND. 1985. *The Genus Coelomomyces*. Academic Press, Orlando pp. 399.
25. CRITCHFIELD, S.M & K. BOYCE. 1985. Improved *Romanomermis culicivoxax* preparasite production. *Anual Conference n°53 California Mosquito and Vector Control Association*.
26. CURTO, S. F., R. BOFFI, A. E. CARBAJO, R. PLASTINA & N. SCHWEIGMANN. 2002. Reinfestación del territorio argentino por *Aedes aegypti*. Distribución geográfica (1994-1999). En: D. Salomón (ed.), *Actualizaciones en Artropodología Sanitaria*, Fundación Mundo Sano, Buenos Aires, pp. 127-137.
27. DARSIE, R. F. & C. J. MITCHELL. 1985. The mosquitoes of Argentina, Parts I & II. *Mosquito Systematic* 17: 153-362.
28. DAVEY, R. B. & M.V. MEISCH. 1977. Control of dark rice field mosquito larvae, *Psorophora columbiae*, by mosquito fish *Gambusia affinis* and green sunfish, *Leponis cyanellus*, in Arkansas rice fields. *Mosquito News* 37: 258-262.
29. DZERZHINSKII, V.A. & A.M. DUBITSKII. 1977. A new host of *Tetrahymena stegomyiae*. *Parazitologia* 11: 189.
30. FEDERICI, B.A. 1985. *Coelomomyces*. En: Chapman, H.C (ed.), *Biological Control of Mosquitoes, Bulletin 6, American Control Association* pp. 75-86.
31. FOLLET, P.A & J.J. DUAN. 2000. *Non Target Effects of Biological Control*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London.

32. FUKUDA, T & T.B. CLARK. 1975. Transmission of the mosquito to iridescent virus (RMIV) by adult mosquitoes of *Aedes taeniorhynchus* to their progeny. *Journal of Invertebrate Pathology* 24: 275-276.
33. GARCÍA, J.J. 1989. Primer registro de microsporidiosis en culícidos (Diptera. Culicidae) de la República Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 47 (1-4) : 100-108.
34. GARCÍA, J. J. & J. J. BECNEL. 1994. Eight new species of microsporidia (Microspora) from Argentine mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 64: 243 - 252.
35. GARCÍA, J. J & N. B. CAMINO. 1990. Primera cita para la Argentina de infecciones naturales en larvas de *Culex pipiens* (L.) (Diptera: Culicidae). *Neotrópica* 36: 83-86.
36. GARCÍA, J. J., R. E. CAMPOS & A. MACIÁ. 1994a. Prospección de enemigos naturales de Culicidae (Diptera) de la Selva Marginal de Punta Lara, Provincia de Buenos Aires, República Argentina. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* XIX: 209-215.
37. 1. GARCÍA, J. J., T. FUKUDA & J. J. BECNEL. 1994b. Seasonality, prevalence and pathogenicity of the gregarine *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in mosquitoes from Florida. *Journal of the American Mosquito Control Association* 10 (3) : 413-418.
38. GARCÍA, J. J. & C. C. LÓPEZ LASTRA. 1989. Infecciones por microsporidios y hongos en *Culex dolosus* (Lynch Arribalzaga, 1891) (Diptera. Culicidae) en Argentina y Uruguay. *Neotropica* 35 (93): 9-14.

39. GARCÍA, L.S. 2001. *Diagnostic medical parasitology*. Asm Press, Washington.
40. GARCÍA, R. & A.W. SWEENEY. 1986. The use of microbial pathogens for the control of mosquitoes, Agriculture. *Ecosystems and environment* 15 : 201-208.
41. GEORGHIOU, G.P & T. SAITO. 1983. *Pest Resistance to Pesticides*. Plenum Press, New York and London.
42. GLEISER, R.M., D.E. GORLA & F.F. LUDUEÑA ALMEIDA. 1997. Monitoring the abundance of *Aedes (Oclherotatus) albifasciatus* (Macquart 1838) (Diptera: Culicidae) to the south of Mar Chiquita Lake, central Argentina, with the arial of remote sensing. *Annales of Tropical Medicine and Parasitology* 91: 917-926.
43. GODDARD, J. 2000. *Infectious diseases and arthropods*. Humana Press, Totowa, New Jersey.
44. GORDON, R., C.H. BAILEY & J.M. BARTER. 1974. Parasitic development of the mermithid nematode *Reesimermis nielsenii* in the larval mosquito *Aedes aegypti*. *Canadian Journal of Zoology* 52: 1923.
45. GRASSMICK, R.A. & W.A. ROWLEY. 1973. Larval Mortality of *Culex tarsalis* and *Aedes aegypti* when reared with different concentrations of *Tetrahymena pyriformis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 22: 86-93.
46. GUZMAN, D.R & R.C. AXTELL. 1987. Populations dynamics of *Culex quinquefasciatus* and the fungal pathogen *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) in stagnant water pools. *Journal of the American Mosquito Control Association* 3 (3): 442-449.

47. HACK, W.H., G.J. TORALES, N.E. BAR & B. OSCHEROV. 1978. Observaciones etológicas sobre culícidos de Corrientes. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 37: 137-151.
48. HALL, D.W & D.D. FISH. 1974. A baculovirus from the mosquito *Wyeomyia smithii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 23: 383-388.
49. HOY, J.B & D.E. REED. 1971. The efficacy of mosquitofish for control of *Culex tarsalis* in a California ricefields. *Mosquito News* 31: 567-572.
50. HUNTER-FUJITA, F. R., P.F. ENTWISTLE, H. F. EVANS & N. E. CROOK. 1998. *Insects Viruses and Pest Management*. John Wiley & Sons, Chichester.
51. IGNOFFO, C. M, K.D. BIEVER, W. W. JOHNSON, H. O. SANDERS, H. C. CHAPMAN, J. J. PETERSEN & D. B. WOODARD. 1973. Susceptibility of aquatic vertebrates and invertebrates to the infective stages of the mosquito nematode *Reesimermis nielsenii*. *Mosquito News* 33: 599-602.
52. IGNOFFO, C.M, J. J. PETERSEN, H. C. CHAPMAN & J. F. NOVOTNY. 1974. Lack of susceptibility of mice and rats to the mosquito nematode *Reesimermis nielsenii* Tsai and Gundman. *Mosquito News* 34: 425-428.
53. JARONSKI S.T & R.C. AXTELL. 1982. Effects of organic water pollution on the infectivity of the fungus *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) for the larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): Field and laboratory evaluation, *Journal of Medical Entomology* 19 (3): 255-262.
54. JENKINS, D.W. 1964. Pathogens, parasites and predators of medically important arthropods. Suppl. vol. 30, *Bulletin World Health Organization* 150 pp.

-
55. JOHNSON, A. A. & M. G. KLEVE. 1996. *Strelkovimermis cuticauda* n. sp. and *Strelkovimermis buccalis* n. sp. (Nematoda: Mermithidae) from adult chironomids (Diptera: Chironomidae) from Lake Itasca, Minnesota. *Journal of Parasitology* 82: 478-483.
56. KAYA, H. K & S. P. STOCK. 1997. Techniques in insect nematology. En: LACEY, L.A. (ed.), *Biological techniques "Manual of techniques in insect pathology"*, Academic Press, pp 281-324.
57. KERWIN, J. L & E. PETERSEN. 1997. Fungi: Oomycetes and Chytridiomycetes. En: LACEY, L.A. (ed.), *Biological techniques "Manual of techniques in insect pathology"*, Academic Press, pp. 251-268.
58. KERWIN, J.L & R.K. WASHINO. 1986. Ground and aerial application of the sexual and asexual stages *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) for mosquito control. *Journal of American Mosquito Control Association* 2 (2) : 182-189.
59. KERWIN, J.L & R.K. WASHINO. 1988. Field Evaluation of *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) and description of a natural epizootic involving a new isolate of the fungus, *Journal of Medical Entomology* 25 (6): 452-460.
60. KERWIN, J. L., K. A. ZURAKOWSKI & R. K. WASHINO. 1990. Carbohydrate-mediated recognition of larval mosquito hosts by *Romanomermis culicivorax*. *Journal of Nematology* 22 (1) : 119-126.
61. LACEY, L.A. 1997. *Biological techniques "Manual of techniques in insect pathology"*, Academic Press, San Diego.
62. LACEY, L. A. & H. KAYA. 2000. *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, Kluwer Academic Publishers.

63. LACEY, L. A & J. M. LACEY. 1981. The larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (h-14) against mosquitoes of the central Amazon basin. *Mosquito News* 41: 266-270.
64. LACEY, L.A & S. SINGER. 1982. Larvicidal activity of new isolates of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* (H-14) against anopheline and culicine mosquitoes. *Mosquito News* 44: 26-32.
65. LANE, J. 1953. *Neotropical Culicidae I & II, Universidade Sao Paulo, Brazil.*
66. LAIRD, M. 1988. *The natural history of larval mosquito habitats. Academic Press, London.*
67. LIGHTTOWLER, C. H., F. SIRL, R. BÖKENHAN & M. C. MERCADO. 1992. Investigación de la prevalencia de *Dirofilaria immitis* en caninos de Capital Federal y conurbano bonaerense. *Pet's*, 40 (8): 9-12.
68. LÓPEZ LASTRA, C. C. 1990a. Primera cita de *Smittium morbosum* var. *rioplatensis* nov (Trichomycetes:Harpellales) patógeno de 5 especies de mosquitos (Diptera:Culicidae) en la República Argentina . *Revista. Argentina de Micología* Tomo XIII (2) : 14-18.
69. LÓPEZ LASTRA, C. C. 1990b. Primer registro de *Aphanocladium album* (Deuteromycotina:Hyphomycetes) como patógeno de insectos en la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 26 (3-4): 259-260 .
70. LÓPEZ LASTRA, C. C. & J. J. GARCÍA. 1997. Presencia del hongo *Coelomomyces iliensis* var. *indus* como patógeno de larvas de mosquitos (DIPTERA:

- CULICIDAE) en la República Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología* 14: 69-71.
71. LÓPEZ LASTRA, C. C., J. J. GARCÍA & G. R. REBOREDO. 1991. Efecto de la temperatura y la salinidad sobre la viabilidad y producción de conidios en los hongos entomopatógenos: *Tolyocladium cylindrosporum* y *Aphanocladium album* (Deuteromycotina:Hyphomycetes). *Boletín de Micología* 6(1-2): 43-47.
72. LÓPEZ LASTRA, C. C., M. M. STECIOW & J. J. GARCÍA. 1999. Registro mas austral del hongo *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales) como patógeno de larvas de mosquitos (Diptera: Culicidae). *Revista Iberoamericana de Micología* 16: 143-145.
73. LORD, J. C, T. FUKUDA & E. DANIELS. 1988. Salinity tolerance of *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales) a fungal pathogen of mosquito larvae. *Journal of the American Mosquito control Association* 4 (3): 370-371.
74. MACIÁ, A., J. J. GARCÍA & R. E. CAMPOS. 1995. Bionomía de *Aedes albifasciatus* y *Ae. crinifer* (Diptera: Culicidae) y sus enemigos naturales en Punta Lara, Buenos Aires. *Neotrópica* 41: 43-50.
75. MARQUARDT, W. C., R. S. DEMAREE & R. B GRIEVE. 2000. *Parasitology & Vector Biology*. Academic press, San Diego.
76. MCCLELLAND, G. A. H. 1984. *Medical Entomology*. University of California, Davis.
77. MCINNIS, T. JR., L. SCHIMMEL, R. NOBLET. 1985. Host range studies with the fungus *Leptolegnia*, a parasite of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 22(2) : 226-227

78. MCLAUGHLIN, R. E & J. BILLODEAUX. 1983. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against *Psorophora columbiae* breeding in rice fields. *Mosquito News* 43: 30-33.
79. MEISH, M. V. 1985. *Gambusia affinis*. En: Chapman, H (ED.), *Biological Control of mosquitoes*, Bulletin 6, American Mosquito Control Association, California pp. 3-17.
80. MEYER, P & G. MILANTA. 1997. Evolución explosiva de la filariasis canina en Argentina. Período 1982-1985. *Pet's* 70 (13): 224-225
81. MICIELI, M. V. & J. J. GARCIA. 1999. Estudios epizootiológicos de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda: Memithidae) en una población natural de *Aedes albifasciatus* Macquart (Diptera: Culicidae) en la Argentina. *Miscel.lània Zoològica* 22: 31-37.
82. MICIELI, M. V., J. J. GARCÍA & J. J. BECNEL. 2000. Horizontal transmission of *Amblyospora albifasciati* Garcia and Becnel, 1994 (Microsporidia: Amblyosporidae) to a copepod intermediate host and the Neotropical mosquito, *Aedes albifasciatus* (Macquart, 1837). *Journal of Invertebrate Pathology* 75: 76-83.
83. MICIELI, M. V., J. J. GARCÍA & T. G. ANDREADIS. 2001. Epizootiological studies of *Amblyospora albifasciati* (Microsporidia: Amblyosporidae) in natural populations of *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae) and *Mesocyclops annulatus* (Copepoda: Cyclopidae) in a transient floodwater habitat. *Journal of Invertebrate Pathology* 77: 68-74.
84. MICIELI, M.V., G. A. MARTI & J.J. GARCÍA. 2002. Laboratory evaluation of the predation of the neotropical copepod *Mesocyclops annulatus* upon mosquito larvae. *Memoria do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 835-838.

85. MUNSTERMANN, L.E. & D.W. WESSON. 1990. First record of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in north american *Aedes albopictus*. . *Journal of the American Mosquito Control Association* 6 (2) : 235-243.
86. O.M.S.2003. www.who.int/mediacentre/releases/2003/pr33/es
87. O.M.S.2004. www.who.int/infectiousdisease-report/idr99-spanish/pages/ch3text
88. O.M.S.2004. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs102/en
89. O.P.S.2000. www.paho.org/spanish/HCP/HCT/VBDdengue.htm.
90. O.P.S. 2004. Organización panamericana de la salud. *Revista de Salud Pública* vol. 15: 2.
91. PETERSEN, J. J. 1972. Factors affecting sex determination in a mermithid parasite of mosquitoes. *Mosquito News* 32, 226-230.
92. PETERSEN, J. J. 1975. Development and fecundity of *Reesimermis nielseni*, a nematode parasite of mosquitoes. *Journal of Nematology* 7: 211-214.
93. PETERSEN, J. J. 1976. Satus and future of mermith nematodes as control agents of mosquitoes. *En: Proc. 1 st Inst. Colloquium of Invertebrate Pathology, Kingston, Ontario* pp. 236.
94. PETERSEN, J. J. 1978. Observations on the mass production of *Romanomermis culicivorax*, a nematode parasite of mosquitoes. *Mosquito News* 38: 83-86.

95. PETERSEN, J. J. 1979. pH as a factor in parasitism of mosquito larvae by the mermithid *Romanomermis culicivora*. *Journal of Nematology* 11: 105-106.
96. PETERSEN, J. J. 1981. Comparative susceptibility of larval mosquitoes exposed separately by instar or in mixed populations to the nematode *Romanomermis culicivora*. *Journal of Nematology* 13: 228-229.
97. PETERSEN, J. J. 1982. Current status of nematodes for the biological control of insects. *Parasitology* 82.
98. PETERSEN, J. J. 1985. Nematode parasites. En: Chapman, H. C. (Ed.). *Biological Control of Mosquitoes, American Mosquito Control Association, Bulletin n°6, California*, pp. 110-122.
99. PETERSEN, J. J. & H. C. CHAPMAN. 1970. Parasitism of *Anopheles* mosquitoes by a *Gastromermis* sp. (Nematoda: Mermithidae) in southwestern Louisiana. *Journal of the American Mosquito Control Association* 30: 420-424.
100. PETERSEN, J. J. & H. C. CHAPMAN. 1979. Checklist of mosquito species tested against the nematode parasite *Romanomermis culicivora*. *Journal of Medical Entomology* 15: 468-471.
101. PETERSEN, J. J. & O. R. WILLIS. 1970. Some factors affecting parasitism by mermithid nematodes in southern house mosquito larvae. *Journal of Economic Entomology* 63: 175- 178.
102. PETERSEN, J. J. & O. R. WILLIS. 1972 a. Procedures for the mass rearing of a mermithid parasite of mosquitoes. *Mosquito News* 32: 226-230.

- 103.PETERSEN, J. J. & O. R. WILLIS. 1972 b. Results of preliminary field applications of *Reesimermis nielsenii* (Mermithidae: Nematoda) to control mosquito larvae. *Mosquito News* 32: 312-316.
- 104.PETERSEN, J. J. & O. R. WILLIS. 1974. Experimental release of a mermithid nematode to control *Anopheles* mosquitoes in Louisiana. *Mosquito News* 34, 316-319.
- 105.PETERSEN, J. J. & O. R. WILLIS. 1975. Establishment and recycling of a mermithid nematode for the control of mosquito larvae. *Mosquito News* 35, 526-532.
- 106.PETERSEN, J. J. & O. R. WILLIS. 1976. Experimental release of a mermithid nematode to control floodwater mosquitoes in Louisiana. *Mosquito News* 36, 339-342.
- 107.PETERSEN, J. J., H.C. CHAPMAN, O. R. WILLIS & T. FUKUDA. 1978. Release of *Romanomermis culicivorax* for the control of *Anopheles albimanus* en El Salvador. II. Application of the nematode. *American Journal of Medicine and Hygiene* 27 (6) 1268-1273.
- 108.PLATZER, E.G. & L.L. MACKENZIE-GRAHAM. 1980. *Cyclops vernalis* as a predator of the preparasitic stages of *Romanomermis culicivorax*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 40: 252-257.
- 109.PLATZER, E.G & A.M. STIRLING. 1971. Improved rearing procedures for *Romanomermis culicivorax*. *Annual Conference n° 39, California Mosquito and Vector Control Association*.
- 110.POINAR, G.O. Jr. 1979. *Nematodes for biological control of insects*, CRC Press, Boca Raton.

111. POINAR, G.O. Jr. & N.B. CAMINO. 1986. *Strelkovimermis spiculatus* n. sp. (Mermithidae: Nematoda) parasitizing *Aedes albifasciatus* Mac. (Culicidae: Diptera) in Argentina. *Journal of Nematology* 18, 317-319.
112. PROSEN, A. F., A. MARTÍNEZ & R.V. CARCAVALLO. 1960. La familia Culicidae (Diptera) de la rivera fluvial de la provincia de Buenos Aires. *Anales del Instituto de Medicina Regional* 5: 101-113.
113. RAÑA, J. C., O. R. QUAINO, & D. H. PATERNO. 1971. Informe sobre daños provocados por mosquitos en la zona del Departamento San Cristóbal, limítrofe con Córdoba y Santiago del Estero. Informe técnico INTA EERA, Rafaela.
114. REID, J. W. 1985. Clave de identificación e lista de referencias bibliográficas para as espécies continentais sudamericanas de vida livre da orden cyclopoida (Crustacea:Copepoda). *Boletim Zoologico Universidade Sao Paulo* 9, 17-143.
115. REYES-VILLANUEVA F., J.J. BECNEL, J. F. BUTLER. 2001. Morphological traits for distinguishing extracellular gamonts of *Ascogregarina culicis* and *Ascogregarina taiwanensis* in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 77: 227-229.
116. RINGUELET, R. A. 1958. Los crustáceos copépodos de las aguas continentales de la República Argentina. *Sinopsis sistemática. Contribuciones Científicas Facultad Ciencias Exactas, Físicas y Naturales Universidad Buenos Aires, Zoología* 1, 35-126.

- 117.ROBERTS, D.W. 1970. *Coelomomyces, Entomophthora, Beauveria & Metarrizium* as parasites of mosquitoes. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America* 7: 140-155.
- 118.ROBERTS, D. W. & J. M. CASTILLO. 1980. *Bibliography on Pathogens of Medically Important Arthropods*. Suppl. to vol. 58, *Bulletin World Health Organization* pp. 197.
- 119.ROBERTS, D. W. & M. A. STRAND. 1977. *Pathogens of Medically Important Arthropods*. Suppl. N°1 to vol. 55 *Bulletin World Health Organization* pp. 419.
- 120.ROBERTS, D. W., R. A. DAOUST & S. P. WRAIGHT. 1983. *Bibliography on pathogens of medically important arthropods: 1981 Supplement N°1* vol. 83 *Bulletin World Health Organization* pp. 137
- 121.RODRÍGUEZ, J., I. GARCÍA GARCÍA, M. DÍAZ, I. GARCÍA ÁVILA & J. ELADIO SÁNCHEZ. 2003. Efecto patogénico del nemátodo parásito *Strelkovimermis spiculatus* en larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus* en condiciones de laboratorio en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 55 (2):124-125.
- 122.ROSSI, G. C., N. T. PASCUAL & F. J. KRISTICEVIC. 1999. First record of *Aedes albopictus* (Skuse) from Argentina. *Journal of the American Control Association* 15 (3): 422.
- 123.SABATTINI . M. S., T. P. MONATH, C. J. MITCHELL, J. F. DAFFNER, G. S. BOWEN, R. PAULI & M. S. CONTIGIANI. 1985. Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. I. Historical aspects and descriptions of study sites. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34: 937-944.
- 124.SANTAMARINA MIJARES, A. & A. C. BELLINI. 2000. Producción masiva de *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) y su aplicación en

- criaderos de anofelinos en Boa Vista (Roraima), Brasil. *Revista Panamericana de Salud pública*.
- 125.SANTAMARINA MIJARES, A. & R. PÉREZ PACHECO. 1998. Efecto patogénico del nemátodo parásito *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) en larvas del mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio en el Estado de Oaxaca, México. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 50 (1) : 8-11.
- 126.SANTAMARINA MIJARES, A., G. RUÍZ MICHAEL, A. RODRÍGUEZ ESPERANZA, A. BUSTAMANTE HERNÁNDEZ & R. PÉREZ PACHECO. 1996. Effectiveness of *Romanomermis culicivora* (Nematoda: Mermithidae) in *Anopheles pseudopunctipennis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae) in Mexico. *Miscel.lània Zoològica* 19 (1): 33-37.
- 127.SERVICE, M. W. 1993. Mosquitoes. En: Lane R.P & R.W. Crosskey (eds.), *Medical Insects and Arachnids*, Chapman & Hall, London, pp. 120-240.
- 128.SCHULER M. L, H. A.. WOOD, R. R. GRANADOS & D. HAMMER. 1995. *Baculoviruses expression systems and biopesticides*. Wiley-Liss, New York.
- 129.SIEGEL, J. P., R. J. NOVAK & J. V. MADDOX. 1992. Effects of *Ascogregarina barretti* (Eugregarinida: Lecudinidae) infections on *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) in Illinois. *Journal of Medical Entomology* 29 (6) : 968-973.
- 130.SKOVMAND, O, THIERY, I, BENZON, G.L, SINEGRE, G, MONTEY, N & BECKER, N. 1998. Potency of products based on *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* interlaboratory variations. *Journal of the American Mosquito Control Association* 14: 298-304.
- 131.SOKAL, R. R & J. F. ROHLF. 1985. *Biometría*. Freeman & Co., New York.

- 132.SPINSANTI, L., A. L. BASQUIERA, S. BULACIO, V. SOMALE, S.C.H. KIM, V. RÉ, D. RABBAT, A. ZÁRATE, J. C. ZLOCOWSKI, C. QUIROGA MAYOR, M. CONTIGIANI & S. PALACIO. 2003. Encefalitis de San Luis en Argentina: El Primer Caso Comunicado en los Últimos 17 Años. *Emerging Infect Diseases* 9 (2)
- 133.SPRAGUE, V. 1977. *Systematics of the microsporidia. Comparative Pathobiology*, vol. 2. Plenum Press, New York.
- 134.STIRLING, M.A. & E.G. PLATZER. 1978. *Catenaria anguillulae* in the mermithid nematode *Romanomermis culicivorax*. *Journal of Invertebrate Pathology* 32, 348-354.
- 135.SWEENEY, A.W. 1986. Laboratory and field observations on persistence and recycling potential of *Culicinomyces clavisporus*. En : Samson, R.A., J.M. Vlask & D. Peters (eds.) *Fundamental and Applied aspects of invertebrate pathology, Foundation of the fourth Intl.Colloquim of invertebrate pathology*, pp. 175-177.
- 136.SWEENEY, A.W., R. COOPER & B. E. MEDCRAFT. 1983. Field tests of the mosquito fungus *Culicinomyces clavisporus* against the Australian encephalitis vector *Culex annulirostris*. *Mosquito News* 43 (3) : 290-297.
- 137.TANADA, Y. & H. K. KAYA. 1993. *Insect Pathology. Academic Press, New York.*
- 138.THIERY, I. & E. FRACHON. 1997. Identification, isolation, culture and preservation of entomopathogenic bacteria. En: Lacey, L.A (ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology* pp. 55-90.
- 139.WEISER, J. 1991. *Biological Control of Vectors. Wiley & Sons, Chichester.*

140. WINKLER, M.A. 1994. *Tratamiento Biológico de aguas de desecho*. Editorial Limusa, México.
141. ZAIM, M., H. LADONNI, MR. ERSADI, AV. MANOUCHEHRI, Z. SAHABI, M. NAZARI, & H. SHAHMOHAMMADI. 1988. Field application of *Romanomermis culicivorax* (Mermithidae: Nematoda) to control anopheline larvae in southern Iran. *Journal of the American Mosquito Control Association* 4 (3):351-355.
142. ZAINDENBERG, M. 2002. Paludismo en Argentina. En: Salomón, O. D. (ed.), *Actualizaciones en artropodología Sanitaria*, Fundación Mundo Sano, Buenos Aires, pp. 283-289.
143. ZATTAU, W. C. & T. MCINNIS. JR. 1987. Life cycle and mode of infection of *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes) parasitizing *Aedes aegypti*. *Journal of Invertebrate Pathology* 50: 134-145.