

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas.

**Infectividad de *Heterorhabditis bacteriophora* (aislado 4)
(Nematoda: Heterorhabditidae) en larvas de *Aedes aegypti* (L.)
y *Culex quinquefasciatus* Say en condiciones de laboratorio**

Tesinista: Carolina Ulvedal

Firma:

Director: Dr. Walter R. Almirón

Firma:

Codirectora: Dra. María A. Bertolotti

Firma:

Lugar de realización: Cátedra de Parasitología, Facultad de Ciencias
Exactas, Físicas y Naturales. UNC.

2013

**Infectividad de *Heterorhabditis bacteriophora* (aislado 4)
(Nematoda: Heterorhabditidae) en larvas de *Aedes aegypti* (L.)
y *Culex quinquefasciatus* Say en condiciones de laboratorio**

Tribunal Examinador

Dr. Walter R. Almirón

Firma:

Dra. Susana R. Cagnolo

Firma:

Dr. Francisco Ludueña-Almeida

Firma:

Calificación:

Fecha:

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Walter Almirón, por brindarme la posibilidad de realizar esta tesina y permitirme utilizar las instalaciones y recursos humanos de la Cátedra de Parasitología y del Centro de Investigaciones Entomológicas de Córdoba (CIEC).

A la Dra. Alejandra Bertolotti por codirigir este trabajo y brindarme todo su apoyo.

A la Dra. Susana Cagnolo por sus observaciones y consejos.

Al Dr. Francisco Ludueña-Almeida por su colaboración y ayuda en el análisis estadístico.

Al personal del CIEC, especialmente a las Dras. Elizabet Estallo y Marta Grech por su ayuda en la etapa de laboratorio y correcciones del manuscrito.

Al Dr. Gonzalo Batallán, por brindarme sus consejos y parte del material biológico para la realización de este trabajo.

A mis compañeros de Facultad por todas las horas de estudio compartidas.

A mis amigas de la vida por su apoyo y perseverancia.

A mis padres y hermano por brindarme su apoyo.

A mi amor y compañero de vida Sebastián y a mi hijo Felipe por su tolerancia, paciencia y por saber esperar.

A todos ustedes... ¡muchas gracias!

ÍNDICE

Resumen	1-2
Introducción	3-7
Objetivo general.....	7
Objetivos específicos.....	7
Materiales y Métodos	8-11
Cría del hospedador auxiliar.....	8
Cría masiva del nematodo.....	8
Cría masiva de <i>Aedes aegypti</i>	8
Cría masiva de <i>Culex quinquefasciatus</i>	9
Desarrollo del experimento.....	9
Inóculo.....	9
Contacto insecto–nematodo.....	10
Determinación del parasitismo.....	10
Respuesta inmune del mosquito hospedador.....	11
Análisis de datos.....	11
Resultados	12-19
Parasitismo y dosis letal 50 (DL ₅₀) en larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> y <i>Aedes aegypti</i>	12-15
Parasitismo en los diferentes estadios larvales.....	15
Desarrollo y reproducción de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> en <i>Culex</i> <i>quinquefasciatus</i> y <i>Aedes aegypti</i>	16-17
Respuesta inmune del mosquito hospedador.....	18-19
Discusión	20-26
Conclusiones	27
Bibliografía	28-34

RESUMEN

Aedes aegypti y *Culex quinquefasciatus* son reconocidos vectores de los virus Dengue y Encefalitis de San Luis en nuestro país, respectivamente. Un método alternativo al control químico, que se aplica actualmente con estos dípteros, es el empleo de insecticidas biológicos, como los nematodos entomopatógenos. El objetivo general de este trabajo fue evaluar la infectividad de *Heterorhabditis bacteriophora* (aislado 4) proveniente de la ciudad de Córdoba, en larvas de *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. aegypti* en condiciones de laboratorio. Se emplearon 30 larvas de segundo estadio de cada especie de mosquito y se expusieron a diferentes dosis de nematodos: 1:1, 5:1, 15:1, 100:1, 500:1, 750:1 y 1500:1 Juveniles infectivos del nematodo por larva de mosquito (JIs/larva). Se realizaron 4 réplicas con los correspondientes controles por dosis y por especie de mosquito. Los resultados obtenidos se analizaron mediante ANOVA. Los valores de parasitismo variaron entre 2,5 y 80% en *Cx. quinquefasciatus* y entre 4,2 y 92,5% en *Ae. aegypti*, detectándose diferencias significativas entre las dosis ensayadas ($p < 0,0001$). Se estimaron las DL_{50} que resultaron 160,8 JIs/larva para *Cx. quinquefasciatus* y 113,6 JIs/larva para *Ae. aegypti*. Independientemente de las dosis de aplicación, en ambas especies de mosquitos, el tercer estadio larval resultó el más parasitado, difiriendo significativamente de los estadios restantes ($p < 0,0001$). El número total de nematodos que ingresaron en las larvas fue significativamente mayor a partir de la dosis 100:1 y 500:1 para *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. aegypti*, respectivamente ($p < 0,0001$). En ambas especies hospedadoras, se encontraron nematodos adultos en dosis superiores a 5:1 y los valores más altos se registraron a partir de la dosis 500:1, observándose diferencias significativas entre las dosis ($p < 0,0001$). En *Ae. aegypti*, el desarrollo de nematodos adultos fue mayor en todas las dosis evaluadas. Al finalizar el ciclo parasitario se observó la emergencia de nuevos JIs a partir de la dosis 100:1 y las superiores a ésta en *Ae. aegypti* y sólo en la dosis 1500:1 en *Cx. quinquefasciatus*. Los porcentajes de JIs melanizados superaron en todas las dosis el 94% y se observaron principalmente en el tórax en *Cx. quinquefasciatus*. En tanto que, en *Ae. aegypti* en dosis mayores a 15:1 no superaron el 50% y se encontraron principalmente en el tórax y abdomen de las larvas, observándose diferencias significativas entre las regiones corporales en ambas especies ($p < 0,0001$). Se pone en evidencia por primera vez la susceptibilidad de estas dos especies de mosquitos al parasitismo en condiciones de laboratorio de un aislado autóctono de *H. bacteriophora* y su potencial como bioreguladores para el manejo de estos mosquitos plaga.

Palabras Clave: nematodos entomopatógenos, *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, control biológico.

INTRODUCCIÓN

Los mosquitos (Diptera: Culicidae) constituyen uno de los grupos de insectos de mayor importancia médico-veterinaria, desempeñando funciones de reservorios y vectores de patógenos causantes de enfermedades (Almirón & Crocco, 2007). Los arbovirus ("virus transmitidos por artrópodos") ocupan un lugar importante entre los patógenos transmitidos por mosquitos. En Argentina, existen antecedentes de actividad de 24 arbovirus diferentes, sin embargo, para muchos de ellos se desconoce su efecto patógeno para humanos y el papel que desempeñan los animales en su ciclo natural (Calisher *et al.*, 1985; Sabbattini *et al.*, 1998; Sabbattini, 2010). Entre los arbovirus que circulan en nuestro país, se ha detectado actividad de los *Flavivirus* Dengue (DEN), Fiebre Amarilla (FA) y Encefalitis de San Luis (ESL), todos ellos patógenos para humanos (Sabbattini *et al.*, 1998).

El dengue es una enfermedad viral transmitida a través de la picadura de mosquitos del género *Aedes*. Las especies involucradas en la transmisión de este virus son *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis* y *Ae. scutellaris*. En América, hasta el momento, el único vector reconocido es *Ae. aegypti* (Almirón & Crocco, 2007). Originaria de África, esta especie se encuentra distribuida en regiones tropicales y subtropicales del mundo, aunque también se extiende a zonas templadas (Santamarina Mijares *et al.*, 2000). En Argentina, *Ae. aegypti* está presente en el centro y norte del país en las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Misiones, Salta, San Luis, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán (Almirón, 2003; Rossi & Almirón, 2004; Stein *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2006; Vezzani & Carbajo, 2008, Visintin *et al.*, 2009), y su hallazgo más austral corresponde a la provincia de Neuquén, donde se reportó la presencia de huevos en ovitrampas (Grech *et al.*, 2012).

El dengue y la forma grave del dengue son endémicos en más de 100 países ubicados en zonas tropicales y subtropicales de América, el Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental, el Pacífico Occidental y África (W.H.O., 2009). En Argentina, luego de la re-emergencia de esta enfermedad en 1998, se produjeron brotes con casos autóctonos en las provincias de Salta, Jujuy, Misiones, Formosa y Corrientes y se identificaron casos importados en las provincias de Tucumán, Córdoba y Buenos Aires (Eiman *et al.*, 2010). Durante el verano y el otoño de 2009, ocurrió en Argentina la mayor epidemia de dengue con más de 26.000 casos confirmados, afectando el centro y norte del país, registrándose

casos autóctonos en las provincias de Córdoba, Santa Fe, Buenos Aires, Santiago del Estero y Catamarca (M.S.N., 2009a, b; O.P.S., 2009). Además del riesgo por la circulación del virus DEN en el país, la presencia de *Ae. aegypti*, y particularmente la de *Ae. albopictus*, constituye un factor de riesgo importante respecto a otras arbovirosis, como la Fiebre Amarilla ya que pueden contribuir a su re-urbanización (Almirón & Crocco, 2009).

El virus ESL está ampliamente distribuido en América, encontrándose desde Canadá, Estados Unidos de Norteamérica, México e islas del Caribe, hasta el Centro y Sudamérica. En Argentina, su distribución es amplia, abarcando zonas subtropicales y templadas. Este virus fue aislado a partir de mosquitos *Culex quinquefasciatus* y *Culex* spp., de roedores y humanos con enfermedad febril sistémica (Sabattini *et al.*, 1998). Según encuestas serológicas, la actividad del virus ESL se detectó en las provincias de Buenos Aires, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Mendoza, Salta, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán, y como límite sur, en la provincia de Río Negro (Díaz *et al.*, 2003; Spinsanti *et al.*, 2003).

Desde el año 2002, hay una re-emergencia del virus ESL como agente etiológico de encefalitis en humanos en el cono sur de Sudamérica, generando pequeños brotes y epidemias en Argentina (Spinsanti *et al.*, 2003). En la provincia de Córdoba, durante el verano-otoño de 2005, se registró el primer brote por infección con el virus ESL, que también lo fue para Argentina y Sudamérica, en el que se registraron 47 casos y 9 muertes afectando principalmente a adultos mayores (Almirón *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2006; Spinsanti *et al.*, 2008). Durante este brote, se aislaron dos cepas del virus ESL, correspondientes al genotipo III, a partir de *Cx. quinquefasciatus* (Díaz *et al.*, 2006), considerando a estos mosquitos como los principales vectores de este virus. En el año 2010 se notificaron en Argentina 43 casos de ESL, de los cuales 4 fueron reportados en la provincia de Córdoba (O.P.S., 2010). Además de la transmisión del virus ESL, *Cx. quinquefasciatus* se ha relacionado en América, junto con otras especies, como vector del virus del Oeste del Nilo (Sardelis *et al.*, 2001; Ahumada *et al.*, 2004; Marra *et al.*, 2004; Turell *et al.*, 2005) en razón de su preferencia alimenticia, tanto de aves como de humanos (Zinser *et al.*, 2004).

Aedes aegypti y *Cx. quinquefasciatus* son dos de las especies de mosquitos más comunes en los ecosistemas urbanos y se encuentran estrechamente asociadas al hombre, quien les ofrece las condiciones adecuadas para su proliferación: refugio, criaderos y fuente de sangre. En regiones donde conviven las dos especies de mosquitos

(centro y norte del país), pueden compartir los mismos criaderos (Rossi & Almirón, 2004). Por lo tanto, las estrategias de prevención y control deberían encararse de una manera integral para ambas especies (Almirón, 2003).

Uno de los principales problemas que enfrenta actualmente la lucha contra los vectores, es el uso excesivo de sustancias químicas, que además del riesgo de toxicidad que supone para el hombre y los animales, ha llevado a la aparición de resistencia, a la destrucción de los controladores naturales del vector y a la contaminación del entorno. Por estas razones, durante las últimas décadas se ha trabajado en la búsqueda de nuevos métodos de control que sean más seguros ambientalmente. Una de las alternativas propuestas es el uso de agentes biológicos (T.D.R., 1993).

Los nematodos pertenecientes a los géneros *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae) y *Steinernema* (Steinernematidae) son parásitos obligados de insectos. La presencia de sólo un juvenil infectivo dentro del hospedador, causa su muerte a las pocas horas de haberlo infectado. Dado su efecto letal, comparable al de un insecticida químico, estos organismos son considerados interesantes agentes de control biológico (Gaugler & Kaya, 1990; Adams & Nguyen, 2002).

El ciclo biológico de estos nematodos incluye huevo, cuatro estadios juveniles y el adulto; éste se desarrolla principalmente dentro del insecto hospedador y sólo las formas infectivas, que corresponden al tercer estadio larval, se encuentran fuera del mismo. Estos juveniles infectivos (JIs) transportan una bacteria simbiote en su intestino y son los encargados de sobrevivir en el medio hasta que localizan un nuevo hospedador (García del Pino, 1994; Lewis *et al.*, 2006).

Los nematodos penetran en el insecto por las aberturas naturales, boca, ano o espiráculos y en el caso de *Heterorhabditis* también pueden penetrar directamente a través del tegumento intersegmental (Bedding & Molyneux, 1982; Adams & Nguyen, 2002). Una vez instalados en el hemocele del hospedador, liberan la bacteria simbiote a través del ano, la que prolifera, mata al insecto por septicemia, en las primeras 72 horas, y crea un ambiente favorable para el crecimiento y reproducción del nematodo. Esto ocurre en la mayoría de los hospedadores, en los que no se conoce una respuesta de defensa significativa (Sambeek & Wiesner, 1999). En algunos dípteros, sin embargo, se ha observado que el hospedador puede continuar su desarrollo por un tiempo, causando la melanización del nematodo como una reacción defensiva (Poinar & Kaul, 1982). Este proceso involucra el depósito de gránulos de melanina alrededor del cuerpo del nematodo produciendo la muerte del mismo (Poinar & Leutenegger, 1971).

Los nematodos que no son melanizados continúan su ciclo en el hospedador, los JIs pasan al cuarto estadio larval y tras una nueva muda, darán origen a la primera generación de adultos, que está representada por individuos hermafroditas en el género *Heterorhabditis* y por machos y hembras en el género *Steinernema*. Los huevos liberados por hermafroditas y hembras, respectivamente en el cadáver del insecto, se desarrollan en adultos dioicos en ambos géneros de nematodos, que constituyen la segunda generación y que completarán otro ciclo reproductivo. Tanto los adultos hermafroditas como las hembras dioicas retienen una cierta cantidad de huevos en el útero, que eclosionan *in situ* y originan nuevos JIs que destruyen al nematodo progenitor en su desarrollo, mecanismo denominado *endotokia matricida* (Poinar, 1990; Adams & Nguyen, 2002).

En la Familia Mermithidae, a diferencia de las Familias Steinernematidae y Heterorhabditidae, la reproducción ocurre en el ambiente. Del huevo emerge un preparásito (segundo estadio juvenil) que entra al hospedador, se desarrolla a juvenil parásito, luego a juvenil post-parásito que abandona al hospedador y una vez en el ambiente muda al estadio adulto, los machos y hembras se reproducen y luego de la fecundación las hembras oviponen (Stock & Camino, 1996).

Existen numerosos trabajos del efecto patogénico de nematodos y su utilidad como larvicidas biológicos contra diversos insectos. Especies pertenecientes a la Familia Mermithidae, como *Romanomermis culicivorax* y *Romanomermis iyengari* han sido probados sobre larvas de *Ae. aegypti* (Santamarina Mijares *et al.*, 2000; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2005), y han sido ampliamente evaluados contra larvas de mosquitos de los géneros *Culex* y *Anopheles* (Santamarina & González, 1991; Santamarina, 1994). *Strelkovimermis spiculatus* ha mostrado ser también un prometedor agente de biocontrol (Achinelly *et al.*, 2004) y su efecto patógeno ha sido probado sobre larvas de *Cx. quinquefasciatus* (Rodríguez *et al.*, 2003), *Ae. aegypti* (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2005) y *Ae. albifasciatus* (Poinar & Camino, 1986).

Miembros de las Familias Steinernematidae y Heterorhabditidae también fueron utilizados contra dípteros en laboratorio. Entre ellos, *Steinernema feltiae* y *Heterorhabditis heliothidis* mostraron actividad larvicida contra *Ae. aegypti* (Molta & Hominick, 1989) y *H. bacteriophora* contra *Cx. pipiens* (Poinar & Kaul, 1982).

En la ciudad de Córdoba se han llevado a cabo experiencias en laboratorio con especies autóctonas de ambas Familias; en el caso de Steinernematidae, los ensayos con *S. rarum* (OLI) han demostrado que es un eficaz agente de control de larvas de *Ae.*

aegypti (Cagnolo *et al.*, 2007a), *Cx. quinquefasciatus* (Cagnolo & Almirón, 2007) y *Cx. apicinus* (Cagnolo & Almirón, 2010). Con respecto a la Familia Heterorhabditidae, se evaluó la patogenicidad de un aislado de *Heterorhabditis* sp. en larvas de *Ae. aegypti* (Peschiutta, 2009). Sin embargo, no se han realizado pruebas contra *Cx. quinquefasciatus* con ningún representante nativo del género *Heterorhabditis*. Muestreos llevados a cabo en jardines de la ciudad de Córdoba han permitido detectar un nuevo aislado de *H. bacteriophora* (Cagnolo & Carranza, 2007). Se desconoce hasta el presente, su infectividad en laboratorio y su rango de hospedadores. A fin de aportar información original al conocimiento biológico de este aislado y considerando el interés sanitario de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*, se propuso en esta investigación evaluar la infectividad de *H. bacteriophora* en larvas de estas dos especies de mosquitos en condiciones de laboratorio.

Objetivo general

- Evaluar la infectividad de *Heterorhabditis bacteriophora* (aislado 4) proveniente de la ciudad de Córdoba, en larvas de *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio.

Objetivos específicos

- Determinar y comparar porcentajes de parasitismo y DL₅₀ de *H. bacteriophora* para *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. aegypti*.
- Constatar el desarrollo y reproducción de los nematodos dentro de los insectos hospedadores en relación a las dosis probadas.
- Conocer si ocurre melanización como respuesta inmune de los insectos al parasitismo por *H. bacteriophora*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cría del hospedador auxiliar

La multiplicación del nematodo se realizó, sobre larvas de la polilla de la cera, *Galleria mellonella* (Insecta: Lepidoptera). La cría de este insecto se llevó a cabo en recipientes plásticos y con una dieta artificial, a una temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, siguiendo las pautas propuestas por Cagnolo *et al.* (2004).

Cría masiva del nematodo

El aislado de *Heterorhabditis bacteriophora* utilizado fue detectado en una muestra de suelo proveniente de un jardín del Barrio Cerro de las Rosas, de la ciudad de Córdoba (Carranza, 2006). Este aislado se mantiene en cultivo permanente en la Cátedra de Parasitología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (UNC).

Para la cría del nematodo se utilizaron cápsulas de Petri de 5 cm de diámetro, cada una conteniendo dos discos de papel de filtro en su interior. Sobre el disco superior se aplicó una suspensión de 1 ml de JIs del nematodo y se colocaron 5 larvas de *G. mellonella*. Las cápsulas se mantuvieron en estufa a una temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ (Doucet *et al.*, 1996). Al finalizar el ciclo parasitario, entre 7 y 9 días a partir de la infección, las larvas parasitadas del lepidóptero se colocaron en trampas White; éstas se mantuvieron en estufa a 25°C , hasta la emergencia de los nuevos JIs desde los hospedadores. Los JIs se recuperaron con micropipeta y almacenaron en cajas plásticas con agua, la cual fue previamente hervida para esterilizar y declorar, a una temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ (Cagnolo, com. personal).

Cría masiva de *Aedes aegypti*

Los ejemplares utilizados fueron provistos por el Centro de Investigaciones Entomológicas de Córdoba (CIEC) de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (UNC). Para iniciar la cría, se sumergieron huevos contenidos en soportes de papel de filtro, provenientes de colectas realizadas en la ciudad de Córdoba mediante ovitrampas en el marco del Programa de Vigilancia del dengue, en vasos plásticos (6,5 cm de diámetro x 6,5 cm de alto) con 50 ml de agua declorada y se mantuvieron a temperatura entre 25 y 28°C hasta la emergencia de las larvas. En ese momento, se las transfirió a bandejas plásticas conteniendo 750 ml de agua declorada. La alimentación de las larvas consistió en la adición al medio de 0,25 mg diarios/larva de hígado en polvo

(Domínguez *et al.*, 2000). Diariamente se limpió la superficie del agua con papel absorbente para evitar la proliferación de hongos y/o bacterias.

Las pupas se recogieron diariamente y se colocaron en vasos plásticos con 50 ml de agua de clorada. Posteriormente, se dispusieron en una jaula entomológica para mantener a los adultos emergentes. Los machos y hembras se alimentaron con agua azucarada al 10%, embebida en trozos de algodón que se colocaban en vasos de plástico. A los dos días de emergidas las primeras hembras se comenzó a proveerles sangre. La oferta sanguínea fue semanal, y se realizó mediante una rata (*Rattus norvegicus*) inmovilizada, que se colocó dentro de la jaula entomológica durante un tiempo aproximado de 3 horas, durante la mañana o la tarde. Luego se colocaron en la jaula vasos plásticos que contenían en su interior una faja de papel de filtro y 5 ml de agua de clorada que proporcionó una superficie húmeda para la oviposición (Domínguez *et al.*, 2000).

Cría masiva de *Culex quinquefasciatus*

Los ejemplares utilizados también fueron provistos por el CIEC. En el marco del Programa de Vigilancia de la ESL en la ciudad de Córdoba, se colectaron larvas de mosquitos en criaderos ubicados en distintos puntos de la ciudad, las cuales se determinaron a nivel específico en laboratorio. Parte del material fue cedido para este trabajo. La cría de *Cx. quinquefasciatus* se realizó bajo condiciones similares a las utilizadas para *Ae. aegypti*. La alimentación de las hembras de *Cx. quinquefasciatus*, consistió en una oferta sanguínea semanal mediante una codorniz (*Coturnix coturnix*) inmovilizada, que se colocó en la jaula entomológica, durante la noche. Para obtener huevos, se colocaron vasos plásticos, con 50 ml de agua de clorada en su interior, dentro de la jaula, pero sin papel de filtro, ya que esta especie ovipone las balsas directamente en la superficie del agua (Grech, com. personal).

Desarrollo del experimento

- Inóculo

Se utilizaron JIs que no superaron los 30 días de almacenamiento desde la fecha de emergencia del hospedador auxiliar. Los inóculos se prepararon 24 hs antes de comenzar con los ensayos.

Se evaluaron 7 dosis: 1:1, 5:1, 15:1, 100:1, 500:1, 750:1 y 1500:1 JIs de nematodos por larva de mosquito. Para obtener dichas dosis, primero se extrajo una solución

concentrada de nematodos de las cajas de almacenamiento y se agregó agua declorada hasta un volumen final conocido. Seguidamente, con una micropipeta se tomó una alícuota de 1 ml, y bajo lupa binocular, se contabilizó el número de nematodos. Esta acción se repitió 5 veces, para obtener un promedio de los JIs presentes en dicha alícuota. Finalmente, por regla de tres simple se calculó la cantidad de solución necesaria con el número de nematodos para conformar la dosis.

- **Contacto insecto-nematodo**

En una primera instancia se realizó el ensayo con *Cx. quinquefasciatus*, una vez finalizado se procedió con el ensayo de *Ae. aegypti*. Las infecciones se llevaron a cabo en el transcurso de un día en bandejas plásticas (9 x 9 x 3,5 cm) identificadas de acuerdo a la dosis y a la réplica a utilizar. En cada una de ellas se colocaron 30 larvas de mosquito de segundo estadio, extraídas con pipeta de las bandejas de cría del insecto y colocadas en 80 ml de agua declorada, conteniendo la cantidad adecuada de nematodos según la dosis. Para cada especie de mosquito se realizaron cuatro réplicas por cada dosis con su correspondiente control. Este último, se preparó de manera similar pero sin la adición de JIs al medio. Las bandejas se mantuvieron a una temperatura entre 25 y 28°C, con período de luz - oscuridad de 12 hs, el volumen de agua de las mismas se mantuvo en 80 ml, con reposición de agua ante disminuciones por evaporación o manipulación. Las larvas de mosquito fueron alimentadas mediante la adición al medio de 0,25 mg diarios/larva de hígado en polvo. Diariamente se limpió la superficie del agua con papel absorbente para evitar la proliferación de hongos y/o bacterias.

- **Determinación del parasitismo**

Se realizaron observaciones bajo lupa binocular cada 24 hs para registrar la muerte de las larvas de mosquito. El período de observación se extendió hasta el estado de pupa. Las larvas muertas fueron transferidas individualmente a cápsulas multiwell y se siguió su evolución por 7 días más mediante observaciones por transparencia de la cutícula, a fin de registrar el desarrollo y reproducción de los nematodos dentro del insecto hospedador. Transcurridos los 7 días, todas las larvas muertas se disecaron en solución de Ringer a fin de constatar si la muerte de los insectos se debió a los nematodos. Se registró el número de larvas parasitadas, estadios larvales en los que se observó parasitismo, número total de nematodos que ingresaron en las larvas, número de nematodos que alcanzó el estado

adulto y ocurrencia de *endotokia matricida*. Se calculó la dosis letal 50 (DL₅₀) para cada especie de insecto.

- **Respuesta inmune del mosquito hospedador**

La respuesta inmune de las especies hospedadoras frente al ataque de los entomopatógenos se evaluó a partir de la observación de nematodos melanizados por transparencia de la cutícula del hospedador. Posteriormente, ésto se corroboró mediante disecciones en solución de Ringer. Se contabilizaron los nematodos melanizados en las distintas regiones corporales del insecto y se calcularon los porcentajes de JIs melanizados.

Análisis de datos

Para detectar diferencias significativas en las variables mortalidad larval por nematodos, número total de nematodos que ingresaron en las larvas, número de JIs melanizados y número de nematodos adultos desarrollados en el interior de los dípteros en función de las concentraciones aplicadas, se realizaron análisis de la varianza a un factor. Para la comparación de medias se llevó a cabo un test LSD Fisher por cada especie. Se realizaron también análisis de la varianza a un factor para detectar diferencias significativas en las variables mortalidad larval por nematodos en función del estadio de desarrollo y número de JIs melanizados en función de las distintas regiones corporales por cada especie de mosquito. Se efectuó la correspondiente verificación de supuestos. Se aplicó transformación logarítmica ($\log_{10}(x+1)$) a las variables número de adultos desarrollados en ambas especies de mosquitos con el fin de aproximar su distribución al de una distribución normal. Para el cálculo de la DL₅₀, se procedió a la transformación logarítmica ($\log_{10}(x+1)$) de las dosis y a la transformación probit de las proporciones de mortalidad por nematodos. Posteriormente, se realizó un análisis de regresión lineal. Los análisis estadísticos se efectuaron con el software InfoStat versión 2013 (Di Rienzo *et al.*, 2013).

RESULTADOS

Parasitismo y dosis letal 50 (DL₅₀) en larvas de *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*

En ambas especies hospedadoras la mortalidad larval se detectó en la primera revisión a las 24 horas posteriores al contacto con los nematodos. En *Cx. quinquefasciatus* los mayores porcentajes de mortalidad se observaron entre el cuarto y quinto día (22 y 24%), en tanto que en *Ae. aegypti* sucedieron entre el segundo y tercer día (28 y 41%) (Figura 1).

Los valores de parasitismo obtenidos variaron entre 2,5 y 80% en *Cx. quinquefasciatus* y entre 4,2 y 92,5% en *Ae. aegypti*, para las dosis 1:1 y 1500:1, respectivamente. En *Cx. quinquefasciatus* se registró mortalidad en todas las dosis y el porcentaje aumentó al incrementarse las mismas. Valores de parasitismo inferiores a 15% correspondieron a dosis menores a 15:1. A partir de la dosis 100:1 los porcentajes superaron el 50% (Figura 2). En *Ae. aegypti* se observó una tendencia similar en el parasitismo, a excepción de la dosis 5:1 en la que no se registró muerte por nematodos (Figura 3). En ambas especies hospedadoras los porcentajes fueron en aumento a partir de la dosis 100:1, registrándose diferencias significativas entre la misma y las superiores ($F_{Cx. quinquefasciatus} = 82,77$; $gl = 7$; $p < 0,0001$) ($F_{Ae. aegypti} = 316,22$; $gl = 7$; $p < 0,0001$). Los valores de DL₅₀ obtenidos fueron 160,8 Jls/larva para *Cx. quinquefasciatus* y 113,6 Jls/larva para *Ae. aegypti* (Figura 4a, b).

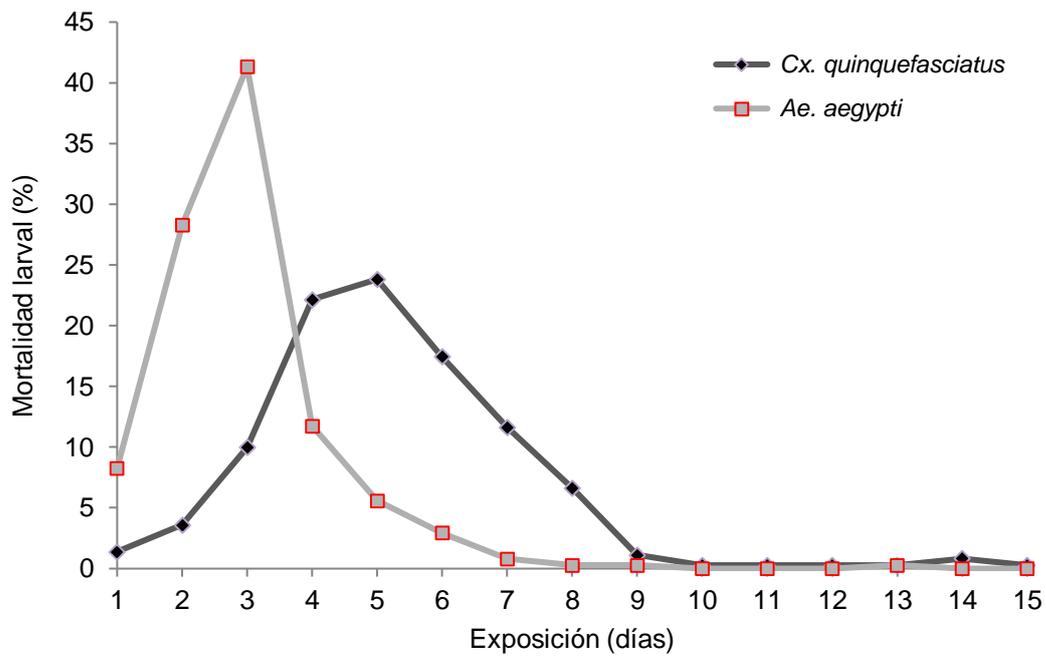


Figura 1. Evolución del parasitismo en larvas de *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti* en función de los días de exposición a *Heterorhabditis bacteriophora*.

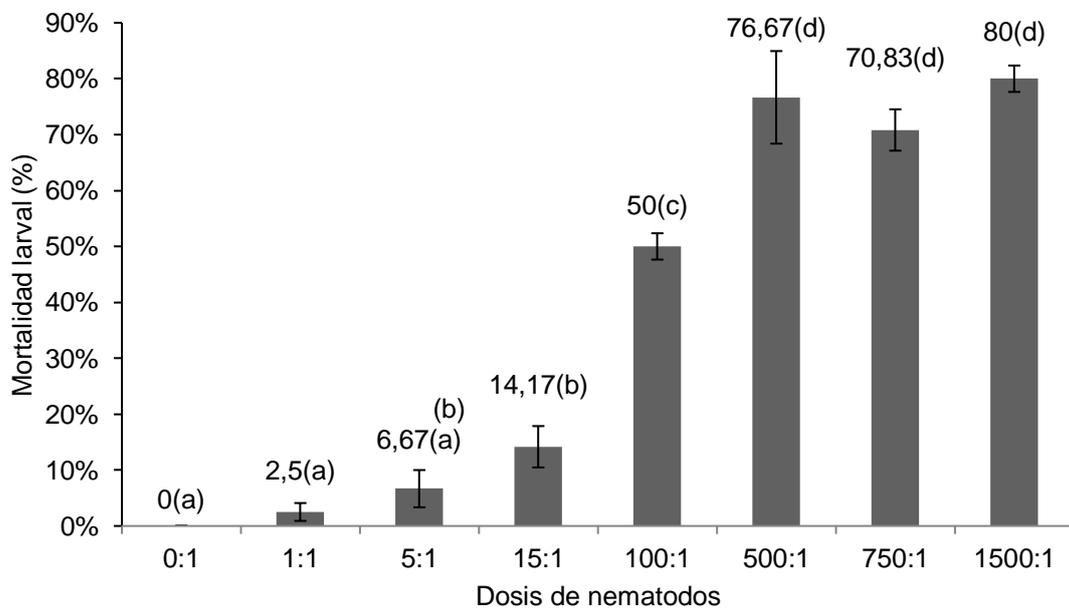


Figura 2. Porcentaje \pm error estándar de mortalidad de larvas de *Culex quinquefasciatus*, en función de las dosis de nematodos aplicadas. Letras distintas entre las barras indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

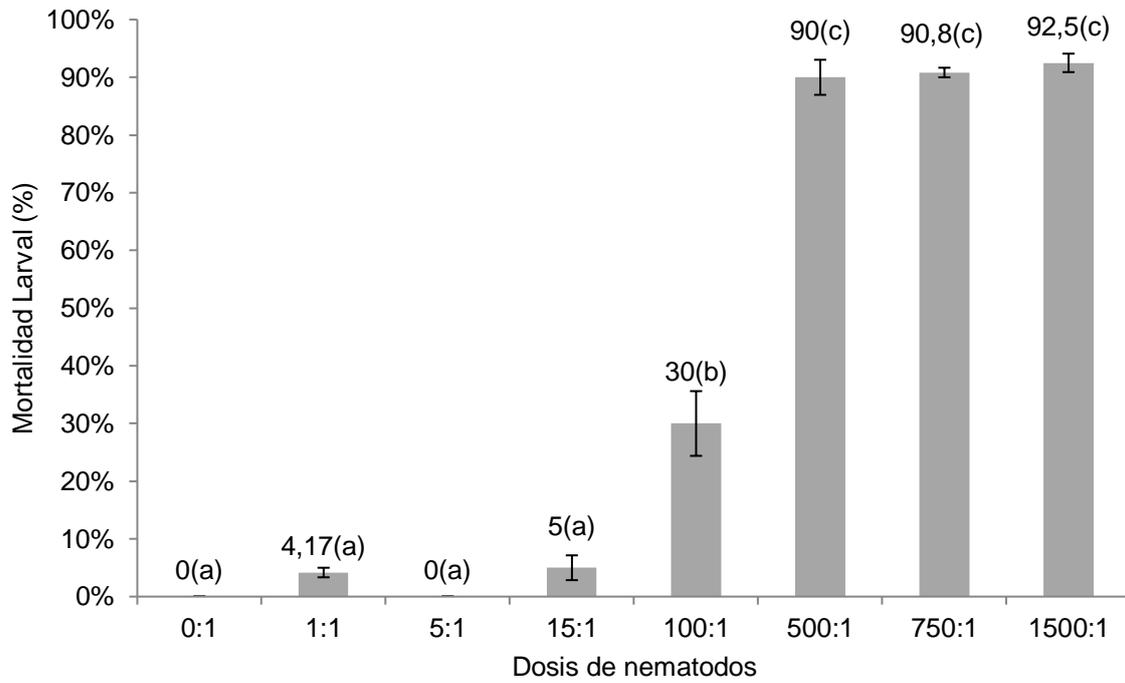


Figura 3. Porcentaje \pm error estándar de mortalidad de larvas de *Aedes aegypti*, en función de las dosis de nematodos aplicadas. Letras distintas entre las barras indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

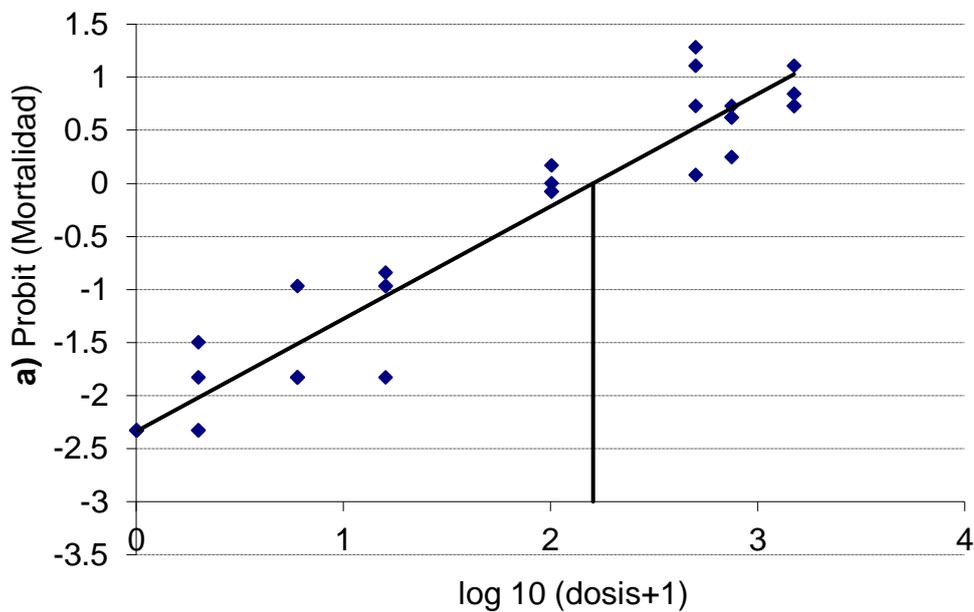


Figura 4. a. Dosis letal 50 de *Heterorhabditis bacteriophora* para larvas de *Culex quinquefasciatus*

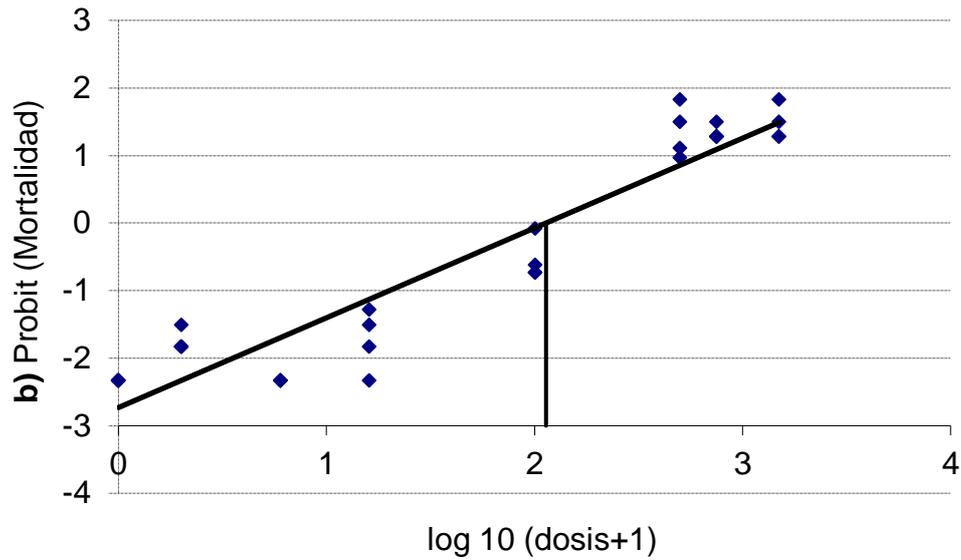


Figura 4. b. Dosis letal 50 de *Heterorhabditis bacteriophora* para larvas de *Aedes aegypti*

Parasitismo en los diferentes estadios larvales

En ambas especies de mosquitos hospedadores los estadios larvales II, III y IV resultaron parasitados por *Heterorhabditis bacteriophora*. Independientemente de las dosis de nematodos aplicados, el tercer estadio presentó los porcentajes más altos de parasitismo, difiriendo significativamente de los estadios restantes ($F_{Cx. quinquefasciatus} = 14,58$; $gl = 2$; $p < 0,0001$) y ($F_{Ae. aegypti} = 12,58$; $gl = 2$; $p < 0,0001$) (Tabla 1).

Tabla 1: Valor medio \pm error estándar (%) de parasitismo por *Heterorhabditis bacteriophora* en los distintos estadios larvales de *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*.

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

Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

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

Las disecciones mostraron diferencias en el desarrollo de los nematodos entre las dosis evaluadas. En *Cx. quinquefasciatus* el porcentaje de JIs que se desarrolló a individuos adultos (hembras hermafroditas), varió entre 4 y 6%, en tanto que, en *Ae. aegypti* el porcentaje varió entre 12 y 61%. En ambas especies, se encontraron individuos adultos en dosis superiores a 5:1 y los valores más altos se registraron a partir de la dosis 500:1, difiriendo significativamente de la dosis 100:1 ($F_{Cx. quinquefasciatus} = 14,36$; $gl = 7$; $p < 0,0001$) ($F_{Ae. aegypti} = 156,39$; $gl = 7$; $p < 0,0001$) (Tabla 2). El número total de nematodos que ingresaron en los dípteros (nematodos adultos + JIs melanizados) fue significativamente mayor a partir de la dosis 100:1 ($F = 69,34$; $gl = 7$; $p < 0,0001$) en *Cx. quinquefasciatus* y 500:1 ($F = 35,95$; $gl = 7$; $p < 0,0001$) en *Ae. aegypti* (Tabla 2).

En *Cx. quinquefasciatus*, sólo en el 2% del total de larvas parasitadas se encontraron nematodos adultos en su interior, únicamente en la dosis 1500:1. Asimismo, en el 84% de las larvas se encontraron JIs melanizados en todas las dosis ensayadas, y en el 14% de las larvas se observaron adultos y JIs melanizados, a partir de la dosis 15:1 y en las superiores. Sin embargo, el patrón de parasitismo observado en *Ae. aegypti* fue diferente del observado en *Cx. quinquefasciatus*. Del total de larvas parasitadas de *Ae. aegypti*, en el 17% se observaron nematodos adultos, en todas las dosis superiores a 5:1. En tanto que, en el 28% de las larvas se observaron JIs melanizados en todas las dosis, a excepción de la dosis 5:1 donde no hubo parasitismo, y en el 55% se observó el desarrollo de nematodos adultos junto con JIs melanizados, a partir de la dosis 100:1 y en dosis superiores.

La ocurrencia de *endotokia matricida* fue observada por transparencia de la cutícula, en ambas especies hospedadoras (Figura 5a, b). Al finalizar el ciclo parasitario se constató la emergencia de nuevos JIs del cadáver de los dípteros (Figura 5c) en las dosis 100:1, 500:1, 750:1 y 1500:1 en *Ae. aegypti* y sólo en la dosis 1500:1 en *Cx. quinquefasciatus*.

Tabla 2: Valor medio \pm error estándar del número de nematodos adultos, JIs melanizados y número total de nematodos en el interior de larvas de *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti* en las distintas dosis.

		Dosis de nematodos							
		Control	1:1	5:1	15:1	100:1	500:1	750:1	1500:1
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Nematodos adultos	0 \pm 0a	0 \pm 0a	0 \pm 0a	0,15 \pm 0,15a	0,49 \pm 0,08b	0,76 \pm 0,16c	0,63 \pm 0,12bc	0,81 \pm 0,04c
	JIs melanizados	0 \pm 0a	1,25 \pm 0,75ab	5 \pm 1,73ab	14,75 \pm 4,5b	52,25 \pm 3,47c	96 \pm 8,84e	88,25 \pm 3,09de	81,75 \pm 8,04d
	Total de nematodos en el insecto	0 \pm 0a	1,25 \pm 0,75a	5 \pm 1,73a	15,5 \pm 4,94a	54,5 \pm 3,5b	101,75 \pm 9,96c	92 \pm 3,76c	87,25 \pm 8,51c
<i>Aedes aegypti</i>	Nematodos adultos	0 \pm 0a	0 \pm 0a	0 \pm 0a	0,08 \pm 0,08a	1,10 \pm 0,12b	1,77 \pm 0,06c	1,70 \pm 0,10c	1,68 \pm 0,06c
	JIs melanizados	0 \pm 0a	1,75 \pm 0,25a	0 \pm 0a	1,75 \pm 1,03a	8,75 \pm 0,48ab	37,75 \pm 2,63c	43,75 \pm 4,7cd	46,75 \pm 3,28d
	Total de nematodos en el insecto	0 \pm 0a	1,75 \pm 0,25a	0 \pm 0a	2 \pm 0,91a	22,25 \pm 5,02a	97 \pm 10,3b	97 \pm 17,83b	94,25 \pm 7,36b

Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

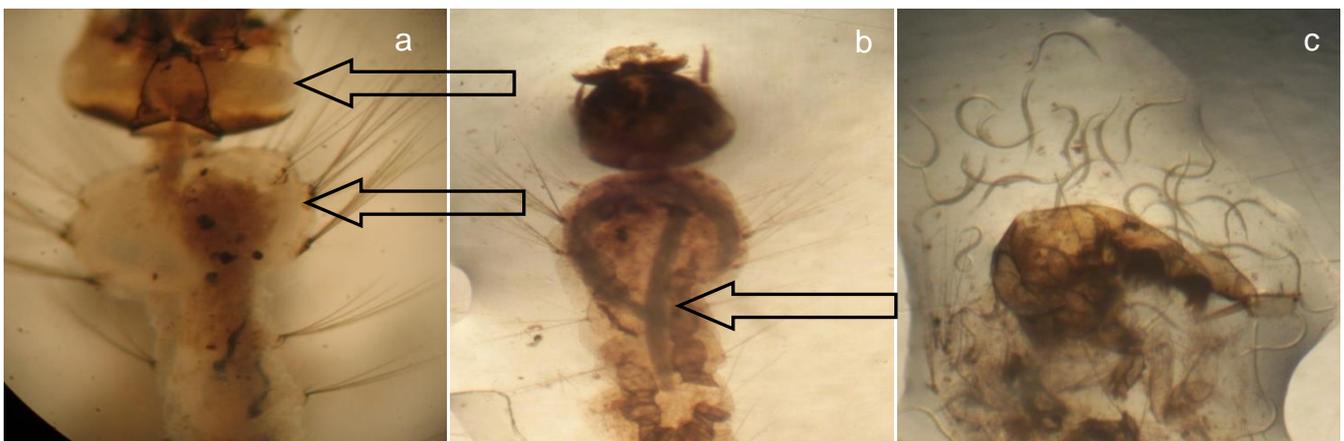


Figura 5. Nematodos adultos de *Heterorhabditis bacteriophora* en endotokia matricida en el interior de una larva de *Culex quinquefasciatus* (a) y de *Aedes aegypti* (b); nuevos JIs emergiendo de una larva de mosquito (c).

Respuesta inmune del mosquito hospedador

La melanización de nematodos como una forma de resistencia del hospedador fue observada en todas las dosis, en ambas especies de mosquitos (Figura 6a, b, c). En *Cx. quinquefasciatus* el número de nematodos melanizados se incrementó con el aumento de las dosis, observándose diferencias significativas ($F= 74,56$; $gl = 7$; $p < 0,0001$), y el mayor valor se registró en la dosis 500:1 (Tabla 2). Los porcentajes de melanización superaron en todas las dosis el 94%, alcanzando el 100% en las dosis 1:1 y 5:1. En tanto que, en *Ae. aegypti* el número de nematodos melanizados fue en aumento a partir de la dosis 100:1, observándose diferencias significativas entre ésta dosis y las superiores ($F= 87,43$; $gl = 7$; $p < 0,0001$). El mayor número de JIs melanizados se registró en la dosis 1500:1 (Tabla 2). A diferencia de lo observado en *Cx. quinquefasciatus*, en dosis mayores a 15:1 en *Ae. aegypti* los porcentajes de melanización no superaron el 50% y sólo en la dosis 1:1 se alcanzó el 100%. El mayor porcentaje de JIs melanizados se observó en el tórax de las larvas en *Cx. quinquefasciatus*, difiriendo significativamente del resto de las regiones corporales ($F = 20,37$; $gl = 3$; $p < 0,0001$) (Figura 7a); mientras que, en *Ae. aegypti* los mayores porcentajes se encontraron principalmente en el tórax y abdomen, observándose diferencias significativas entre éstas y las demás regiones corporales ($F = 11,53$; $gl = 3$; $p < 0,0001$) (Figura 7b,c). En todos los casos, aún si el nematodo resultó melanizado, el hospedador murió.

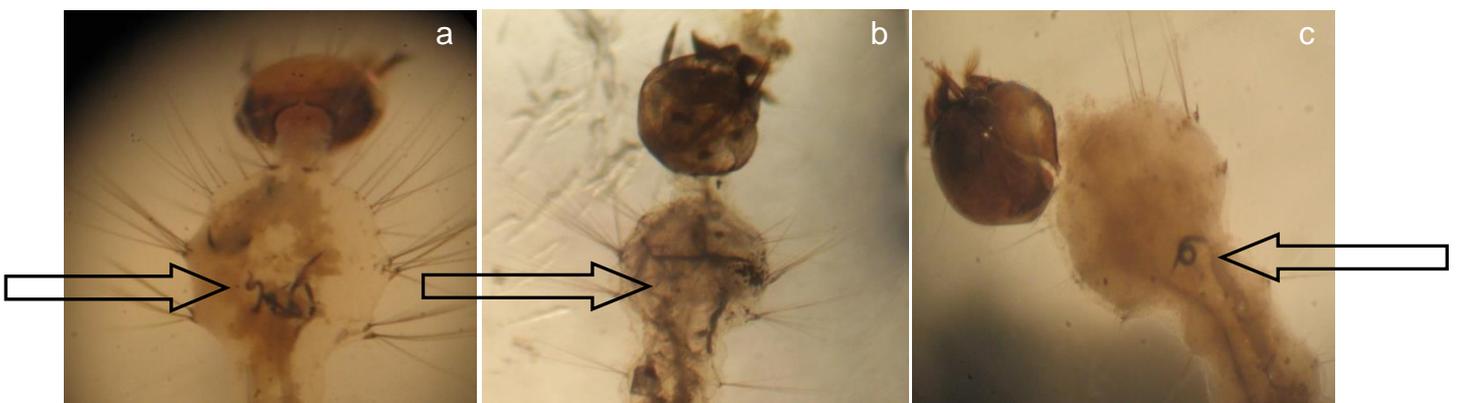


Figura 6. JIs de *Heterorhabditis bacteriophora* melanizados en el tórax de una larva de *Culex quinquefasciatus* (a) y *Aedes aegypti* (b, c).

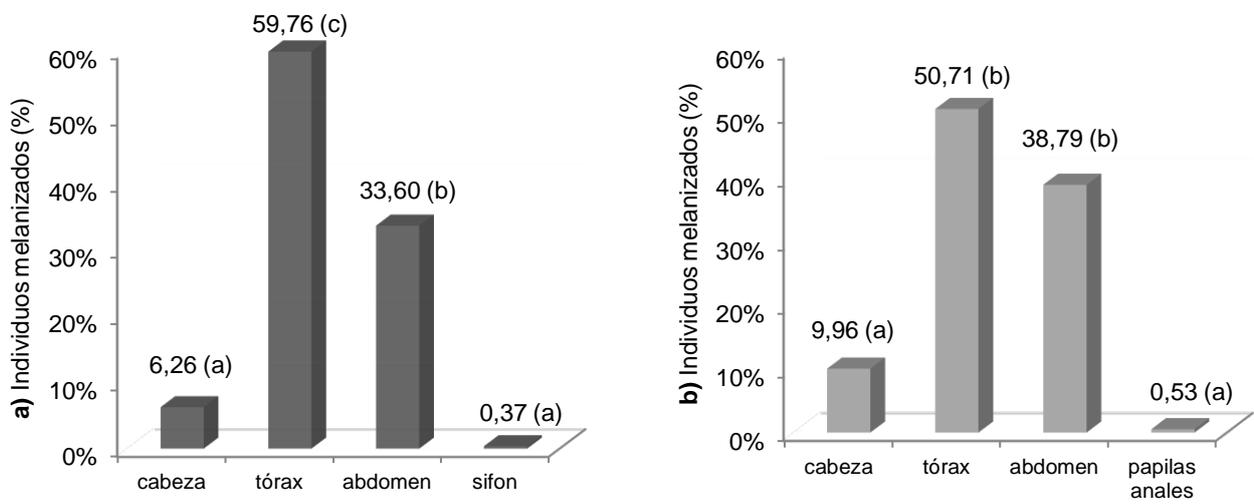


Figura 7. Porcentajes de JIs de *Heterorhabditis bacteriophora* melanizados por *Culex quinquefasciatus* (a) y *Aedes aegypti* (b) en función de las distintas regiones corporales. Letras distintas entre las barras indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo evidencian que *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. aegypti* son susceptibles a diferentes dosis de *H. bacteriophora* (aislado 4) en condiciones de laboratorio. Se pudo observar la ocurrencia de mortalidad larval a las 24 horas posteriores al contacto con los nematodos y se incrementó con el aumento de la dosis, superando en ambos hospedadores el 70% con las tres dosis más altas ensayadas. Sin embargo, en *Ae. aegypti* los mayores porcentajes de parasitismo se alcanzaron en menor tiempo y en las dosis más altas se registró mayor mortalidad.

En *Cx. quinquefasciatus* se observaron resultados similares en un estudio reciente llevado a cabo en la ciudad de El Cairo (Egipto) con aislados locales de *H. bacteriophora* y *H. indica*, bajo condiciones de laboratorio, donde la mayor mortalidad lograda fue de 96 y 80% respectivamente, 48 horas posteriores a la infección, con una dosis menor (300Jls/larva) a la utilizada en este trabajo (Zohdy *et al.*, 2013). En otro ensayo de laboratorio realizado en la ciudad de Berkeley (California- EE.UU.) se obtuvo el 100% de parasitismo en larvas de *Cx. pipiens* con *H. bacteriophora*, a las 48 horas posteriores con una dosis muy superior (6000 Jls/larva) a las de este trabajo (Poinar & Kaul, 1982). Sin embargo, Doucet *et al.* (1999), en un ensayo efectuado en la ciudad de Córdoba (Argentina) no observaron parasitismo en condiciones de laboratorio en larvas de *Cx. pipiens* con un aislado de *H. bacteriophora* detectado en la provincia de Río Negro.

En ensayos realizados con *S. rorum* (OLI), en nuestro laboratorio, igualmente se observó un incremento en la mortalidad larval al aumentar la dosis, alcanzando un porcentaje mayor (89%) en *Cx. quinquefasciatus* para las mismas dosis más altas empleadas en este ensayo (Cagnolo & Almirón, 2007) y un porcentaje similar (75%) en *Cx. apicinus* con una dosis menor (400 Jls /larva) equivalente a la de este trabajo (Cagnolo & Almirón, 2010). En contraste, a los resultados aquí observados, los valores de mortalidad no superaron el 7% en *Cx. quinquefasciatus*, con *S. carpocapsae* y *S. feltiae* ambos aislados provenientes de El Cairo (Egipto) empleados en dosis de entre 50 y 300 Jls/larva, en condiciones de laboratorio (Zohdy *et al.*, 2013). Asimismo, en estudios realizados en laboratorio en Bangkok (Tailandia) sobre larvas de *Cx. gelidus*, vector secundario de encefalitis Japonesa en Asia, con representantes de la Familia Steinernematidae y Heterorhabditidae (*S. carpocapsae* y *H. indica*) se obtuvieron, con ambos aislados, mortalidades más bajas (63 y 13%, respectivamente) con una dosis superior (4000Jls/larva) a las observadas en este trabajo (Pandii *et al.*, 2007).

Los resultados de este trabajo referidos a *Ae. aegypti*, se corresponden con los obtenidos en nuestro laboratorio por Peschiutta (2009), con un aislado de Córdoba de *Heterorhabditis* sp., en los que se observó un incremento en la mortalidad larval con el aumento de la dosis, a partir de las 48 horas posteriores a la infección y alcanzó porcentajes de mortalidad similares (entre 78 y 84%) para las mismas tres dosis más altas empleadas en este ensayo. Del mismo modo, los resultados obtenidos por Cagnolo *et al.* (2007a) en nuestro laboratorio con *S. rarum* (OLI), mostraron un incremento en la mortalidad larval de *Ae. aegypti* con el aumento de la dosis, alcanzando un valor de parasitismo menor (73%) con la misma dosis más alta que la empleada en este ensayo, y con este aislado la mortalidad comenzó a las 24 horas posteriores a la infección, lo que coincide con lo registrado en este trabajo para ambas especies de mosquitos hospedadoras. Por su parte, Molta y Hominick (1989), reportaron resultados semejantes a los presentes en un estudio realizado en condiciones de laboratorio en Berkshire (Inglaterra) con *H. heliothidis* aislado procedente de Nueva Zelandia y *S. feltiae* (aislado DD-136), evaluados en dosis similares a las de este ensayo, observaron un incremento en la mortalidad larval con el aumento de las mismas, con ambos aislados, y mostraron que los heterorabditidos tienen una mayor efectividad en el control de larvas de *Ae. aegypti*.

Por otro lado, en estudios efectuados con nematodos de la Familia Mermithidae, se logró el 100% de mortalidad con dosis menores a las empleadas con los steinernematidos y los heterorabditidos, tanto en *Cx. quinquefasciatus* (Soto Alvares & Santamarina Mijares, 1996; Rodríguez *et al.*, 2003;) como en *Ae. aegypti* (Santamarina Mijares *et al.*, 2000; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2005).

En relación a las diferencias mencionadas en el parasitismo, podrían responder a lo observado por Klein (1990), quien sugirió que la eficacia de cada especie de nematodo puede variar según los países o regiones donde se aplican. Esta variabilidad puede ser debida a diversas causas: a la utilización de diferentes aislados, a los parámetros ambientales que existen en cada país, a las técnicas de aplicación, a la susceptibilidad de la especie de insecto, o a la metodología empleada en la cría y almacenaje de los nematodos.

En este trabajo se obtuvo una DL₅₀ más baja para *Ae. aegypti* que la obtenida para *Cx. quinquefasciatus*. Este hecho, indicaría una mayor virulencia de este aislado sobre *Ae. aegypti*. Zohdy *et al.* (2013), observaron valores de DL₅₀ similares a los obtenidos en este trabajo para *Cx. quinquefasciatus* con los aislados *H. bacteriophora* (121,5 JIs/larva) y *H.*

indica (141,7 Jls/larva). Mientras que, los reportados por Poinar y Kaul (1982) con *H. bacteriophora* para larvas de tercer y cuarto estadio de *Cx. pipiens* fueron más bajos (80 Jls/larva y 63 Jls/larva, respectivamente). Por otro lado, la DL₅₀ obtenida en este trabajo para *Ae. aegypti* difiere con lo registrado por Molta y Homonick (1989), quienes obtuvieron un valor más alto con *H. heliothidis* (141 Jls/larva) y mucho más bajo con *S. feltiae* (1,26 Jls/larva) para este díptero.

Estas diferencias en el valor de DL₅₀ de *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. aegypti* obtenidas en el presente estudio con respecto a otros trabajos, podrían deberse a lo observado por Doucet *et al.* (1992), en estudios realizados en laboratorio sobre *G. mellonella*, quienes mostraron que los valores de DL₅₀ varían entre especies de nematodos así como entre las poblaciones de *H. bacteriophora*, debido a que poseen capacidades infectivas distintas.

La mortalidad de las larvas de mosquitos, independientemente de la dosis de nematodos aplicados resultó mayor en el tercer estadio de desarrollo, en las dos especies hospedadoras. Estos resultados coinciden con los observados por Molta y Hominick (1989), quienes mostraron que el tercer estadio de *Ae. aegypti* fue el más susceptible con los aislados *H. heliothidis* y *S. feltiae*. En *Cx. apicinus*, sólo el tercer estadio larval resultó parasitado con *S. rarum* (OLI) según estudios realizados en nuestro laboratorio por Cagnolo y Almirón (2010).

Resultados similares fueron obtenidos para *Cx. quinquefasciatus* con *H. bacteriophora* (Zohdy *et al.*, 2013) y para *Ae. aegypti* con *Heterorhabditis* sp. (Peschiutta, 2009) donde la mayor mortalidad en ambos casos, se presentó en larvas de tercer y cuarto estadio. En ensayos realizados en *Cx. pipiens* con *H. bacteriophora* el parasitismo en general fue mayor en el cuarto estadio larval. No obstante, se obtuvo el 100% de mortalidad en larvas de tercer y cuarto estadio (Poinar & Kaul, 1982).

Estos resultados difieren con los encontrados por Cagnolo *et al.* (2007a), quienes observaron que la mortalidad en *Ae. aegypti*, ocurrió principalmente en larvas de segundo estadio con *S. rarum* (OLI). Asimismo, en *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. pipiens* y *Ae. aegypti* evaluados con nematodos de la Familia Mermithidae, las larvas de primer y segundo estadio fueron las más parasitadas (Soto Alvares & Santamarina Mijares, 1996; Santamarina Mijares *et al.*, 2000; Achinelly *et al.*, 2004). Sin embargo, en el estudio realizado a campo con *Anopheles* sp. fue el tercer estadio larval el más susceptible al parasitismo por el nematodo mermithido *Reesimermis nielsen* (Petersen & Willis, 1974).

Respecto a las diferencias en la mortalidad por estadio observadas en este trabajo, podrían atribuirse a lo observado por Dadd (1971), quien demostró que los nematodos son físicamente excluidos durante la alimentación en los estadios larvales tempranos, por lo que los estadios mayores son más susceptibles a la infección. Por su parte, Poinar y Kaul (1982) concluyeron que por la pequeña apertura oral, de las larvas de segundo estadio, raramente ingieren nematodos enteros, sino que los trituran con sus dientes mandibulares, causando la muerte de los mismos, mientras que, los estadios mayores podrían ingerirlos sin dañarlos.

No obstante, Soto Alvarez y Santamarina Mijares (1996), observaron que los estadios más jóvenes de mosquitos poseen un reducido engrosamiento de la pared cuticular, permitiendo que los JIs puedan perforar dicha pared con mayor facilidad. Asimismo, los JIs pertenecientes a la Familia Heterorhabditidae poseen un diente cuticular en la región cefálica que utilizan para perforar la cutícula de los insectos que parasitan, lo que representa una vía adicional al ingreso por las aberturas naturales (Bedding & Molyneux, 1982). Al respecto, Peschiutta (2009) señaló que posiblemente los nematodos puedan ingresar en las larvas de segundo estadio y provocar la muerte mediante la proliferación de la bacteria simbiote en los estadios posteriores.

La presente investigación muestra que los estadios infectivos de *H. bacteriophora* (aislado 4) son capaces de ingresar a la cavidad del cuerpo de las larvas de ambas especies hospedadoras y desarrollarse exitosamente, produciendo una nueva generación de JIs de nematodos. Sin embargo, el número de nematodos adultos registrados fue mayor en *Ae. aegypti*, en todas las dosis, a pesar de que el número promedio de JIs que ingresaron en las larvas fue similar en ambas especies de dípteros. Asimismo, la generación de nuevos JIs, al finalizar el ciclo parasitario, se observó a partir de la dosis 100:1 y las superiores a ésta en *Ae. aegypti* y sólo en la dosis más alta en *Cx. quinquefasciatus*. Estos hechos indicarían una mayor susceptibilidad de las larvas de *Ae. aegypti* al parasitismo por este nuevo aislado de *H. bacteriophora*.

El estudio llevado a cabo por Peschiutta (2009), en nuestro laboratorio, en larvas de *Ae. aegypti* infectadas con *Heterorhabditis* sp. proporcionó resultados muy similares, donde se observó el desarrollo de individuos adultos a partir de la dosis 15:1 y un mayor número de nematodos en el interior de las larvas con el aumento de la dosis. Este último hecho además coincide con lo reportado en *Cx. pipiens* con *H. bacteriophora* (Poinar & Kaul, 1982).

Por su parte, Cagnolo *et al.* (2007b), registraron en nuestro laboratorio que en dosis de 500, 750 y 1500 JIs/larva una mayor cantidad de nematodos del aislado *S. rarum* (OLI) continuaron el ciclo parasitario en *Ae. aegypti* hasta reproducirse y generar nuevos JIs. Esto se corresponde con lo registrado por Peschiutta (2009) para este mismo díptero con *Heterorhabditis* sp. en dosis similares. Y de igual modo, con los resultados de estudios llevados a cabo con *S. rarum* (OLI) en *Cx. quinquefasciatus* (Cagnolo & Almirón, 2007) y *Cx. apicinus* (Cagnolo & Almirón, 2010), donde se observó la producción de una nueva generación de JIs de nematodos en las dosis más altas ensayadas.

En este trabajo, si bien se constató la emergencia de nuevos JIs del cadáver del hospedador para cada dosis, no se contabilizó su número. Teniendo en cuenta las diferencias observadas entre ambas especies hospedadoras en la presente investigación, sería interesante abordar su estudio en futuros ensayos de laboratorio a fin de determinar el potencial reproductivo del nematodo a partir de cada especie de mosquito.

Es importante mencionar que el patrón de parasitismo observado en las dos especies hospedadoras fue diferente. En *Cx. quinquefasciatus* el desarrollo de nematodos adultos se registró, en la mayoría de las larvas, acompañada de JIs melanizados y en un porcentaje muy bajo del total de las larvas parasitadas se observó sólo nematodos adultos. En contraste, en *Ae. aegypti* el porcentaje de larvas en las que se observó sólo el desarrollo de nematodos adultos fue mayor, asimismo esta especie presentó un alto porcentaje de larvas donde se observaron nematodos adultos junto con JIs melanizados. Al respecto, Petersen y Willis (1974) reportaron que muchos hospedadores con nematodos melanizados en el hemocele también tienen uno o más nematodos en desarrollo.

En este trabajo, la reacción defensiva de melanización fue mucho más fuerte en *Cx. quinquefasciatus*, donde la mayoría de los nematodos que ingresaron al cuerpo de las larvas fueron melanizados en todas las dosis. En tanto que, en *Ae. aegypti* la melanización ocurrió en menos de la mitad de los nematodos que alcanzaron el hemocele de las larvas y sólo en la dosis más baja se observó la melanización de todos los nematodos que ingresaron. Estas evidencias apoyan a las presentadas anteriormente, sugiriendo que las larvas de *Ae. aegypti* presentarían una mayor susceptibilidad al parasitismo por *H. bacteriophora* (aislado 4) en comparación a las larvas de *Cx. quinquefasciatus*.

Asimismo, en ambas especies la reacción defensiva se incrementó a medida que aumentó el número de nematodos que ingresaron en el cuerpo de los dípteros. Esto coincide con lo observado en *Ae. aegypti* con *Heterorhabditis* sp. (Peschiutta, 2009) y con *S. rarum* (OLI) (Cagnolo *et al.*, 2007b), donde el número de nematodos melanizados se incrementó con el aumento de la dosis y con la cantidad total de nematodos en el interior de las larvas. En *Cx. quinquefasciatus* se observaron resultados similares con *S. carpocapsae* y *S. feltiae*, donde la mayoría de los nematodos fallaron al establecerse en las larvas del mosquito y fueron melanizados (Zohdy *et al.*, 2013).

En contraste, en ensayos realizados en *Ae. aegypti* con los nematodos *H. heliothidis* y *S. feltiae*, se observó que la reacción de melanización disminuyó al aumentar la cantidad de nematodos en el interior de las larvas (7 o más) (Molta & Hominick, 1989). Por su parte, Poinar y Kaul (1982), observaron que las larvas de *Cx. pipiens* fueron capaces de melanizar a los nematodos tan rápidamente que éstos no tuvieron tiempo de liberar su bacteria asociada y sólo luego de alcanzar un número máximo de JIs melanizados (entre 4 y 7), los nematodos adicionales pudieron desarrollarse libremente en el hemocele y liberar su simbiote.

En otros estudios realizados con nematodos de la Familia Mermithidae, donde se evaluó la susceptibilidad al parasitismo en más de 10 especies de mosquitos, entre ellas *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*, en ninguna de éstas se observó la reacción defensiva de melanización (Paily & Balaraman, 2000; Achinelly *et al.*, 2004). Sin embargo, Petersen y Willis (1974) observaron porcentajes variables de JIs de *Reesimermis nielsen* melanizados según el estadio de desarrollo larval en *Anopheles* sp.

Por otro lado, el mayor porcentaje de JIs melanizados se observó en el tórax de las larvas en *Cx. quinquefasciatus*, esto se corresponde con los resultados obtenidos por Pandii *et al.* (2007), en *Cx. gelidus* quienes registraron los mayores porcentajes de JIs melanizados de *S. carpocapsae* en el tórax de las larvas, y con el aislado *H. indica* los JIs melanizados se presentaron sólo en el tórax de los dípteros. En tanto que, en *Ae. aegypti* los JIs melanizados se encontraron principalmente en el tórax y abdomen, esto se corresponde con lo registrado por Peschiutta (2009), con el aislado *Heterorhabditis* sp. para éste mismo díptero. Por su parte, Cagnolo *et al.* (2007b) observaron JIs melanizados de *S. rarum* (OLI) principalmente en el abdomen de las larvas de *Ae. aegypti*.

En este trabajo se determinó además que, en todos los casos aún si el nematodo resultó melanizado, el hospedador murió. Este hecho puede atribuirse a lo observado por Poinar y Kaul (1982), quienes concluyeron que cuando los nematodos eran melanizados

antes de liberar su bacteria asociada, el hospedador frecuentemente desarrollaba septicemia y moría, debido en la gran mayoría de los casos a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, la que se encuentra presente en el tracto alimentario de la larva del mosquito. Las células bacterianas ingresan a través de la entrada hecha por los nematodos y se multiplican en la hemolinfa, resultando una septicemia letal.

Los resultados obtenidos en este trabajo señalan la alta patogenicidad de *H. bacteriophora* (aislado 4) en las dos especies de mosquitos ensayadas. Se sugiere la dosis 500 JIs/larva como la más adecuada para reducir eficazmente la densidad larval de ambas especies en condiciones de laboratorio, ya que la mayor mortalidad, el mayor número de nematodos que ingresaron en los dípteros y el mayor porcentaje de desarrollo de nematodos adultos se registró a partir de esta dosis. No obstante, las larvas de *Ae. aegypti* presentaron una mayor susceptibilidad a este aislado de nematodos.

Baker y Capinera (1997) señalaron que los aislados de nematodos usualmente llegan a ser considerados biotipos o razas que en ocasiones despliegan biología significativamente diferentes. Al respecto, Poinar (1990), sugirió que el mayor éxito se logra con agentes autóctonos, ecológicamente adaptados tanto al ambiente como a las plagas existentes en los ecosistemas donde se aplican.

De acuerdo con lo anterior, la información obtenida en el presente estudio no sólo es importante por demostrar la gran potencialidad de *H. bacteriophora* (aislado 4) como bioregulador de larvas de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*, sino también por tratarse de un aislado autóctono. Sin embargo, los factores bióticos y abióticos tienen marcada influencia en el comportamiento e infectividad de los nematodos entomopatógenos en la naturaleza. En los experimentos en laboratorio, una amplia gama de especies de insectos resultan susceptibles a nematodos entomopatógenos, dado que en esas condiciones el contacto entre nematodos y hospedadores está asegurado, no existen barreras de comportamiento para la infección y las variables ambientales son controladas (Smith, 1999).

Por consiguiente, sería interesante continuar la evaluación de este aislado en condiciones de campo a fin de determinar su infectividad, persistencia, impacto en el ecosistema entre otros aspectos bioecológicos que resulten de interés y así poder determinar su viabilidad de uso como agente de control biológico de larvas de *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. aegypti*.

CONCLUSIONES

✚ Se pone en evidencia por primera vez la susceptibilidad de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* al parasitismo de un aislado autóctono de *Heterorhabditis bacteriophora*.

✚ En ambas especies hospedadoras, a mayor dosis de nematodos se logró mayor mortalidad larval.

✚ En *Ae. aegypti* los mayores porcentajes de parasitismo se alcanzaron en menor tiempo y en las dosis más altas se registró mayor mortalidad en comparación a lo ocurrido en *Cx. quinquefasciatus*.

✚ La DL_{50} fue menor en *Ae. aegypti* que en *Cx. quinquefasciatus*.

✚ En ambas especies hospedadoras, las larvas de tercer estadio resultaron las más parasitadas, independientemente de la dosis de nematodos aplicados.

✚ *Heterorhabditis bacteriophora* es capaz de ingresar a la cavidad del cuerpo de las larvas de ambas especies hospedadoras y desarrollarse exitosamente, produciendo una nueva generación de JIs de nematodos.

✚ En *Ae. aegypti*, el desarrollo de nematodos adultos fue mayor en todas las dosis evaluadas, y la producción de nuevos JIs, al finalizar el ciclo parasitario, se registró en una mayor cantidad de dosis en comparación a lo ocurrido en *Cx. quinquefasciatus*.

✚ La reacción defensiva de melanización se presentó en las dos especies hospedadoras, siendo más fuerte en *Cx. quinquefasciatus*.

✚ Los JIs melanizados se presentaron principalmente en el tórax de las larvas en *Cx. quinquefasciatus* y en el tórax y abdomen en *Ae. aegypti*.

✚ *Heterorhabditis bacteriophora* tiene gran potencial como agente de control biológico de larvas de *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. aegypti*.

✚ *Aedes aegypti* presentó mayor susceptibilidad al parasitismo por *H. bacteriophora*.

BIBLIOGRAFIA

- Achinelly, M.F.; M.V. Micieli; G.A. Martí & J.J. Garcia.** 2004. Susceptibility of neotropical mosquito larvae (Diptera: Culicidae) and non-target aquatic organisms to the entomoparasitic nematode *Strelkovimermis spiculatus* Poinar & Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae). *Nematology* 6: 299-302.
- Ahumada, J.A.; D. Lapointe & M.D. Samuel.** 2004. Modeling the population dynamics of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), along an elevational gradient in Hawaii. *Journal of Medical Entomology* 41:1157- 1170.
- Adams, B.J. & K.B. Nguyen.** 2002. Taxonomy and systematics. pp. 1-33. En: *Entomopathogenic nematology*. Wallingford, UK, CABI Publishing.
- Almirón, W.R.** 2003. Mosquitos de interés médico y veterinario en Argentina. *Temas de Ciencia y Tecnología* Vol. II, No. 4 (Dic 2003/Ene 2004).
- Almirón, W.R.; A. Díaz; L. Spinsanti; V. Ré; A. Visintin; A. Farías & M.S. Contigiani.** 2006. *Culex pipiens quinquefasciatus* y su relación con la encefalitis de San Luis en Córdoba, Argentina. *Revista Argentina de Zoonosis* 1: 24-27.
- Almirón, W.R. & L. Crocco.** 2007. Mosquitos urbanos transmisores de Dengue y Encefalitis de San Luis. Manual de Capacitación docente. Ed. Universitas, 48 pp.
- Almirón, W.R. & L. Crocco.** 2009. Dengue: conocer para prevenir y controlar. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, 42 pp.
- Baker, G.L. & J.H. Capinera.** 1997. Nematodes and Nematomorphs as control agents of grasshoppers and locusts. *Memorirs of the Entomological Society of Canada* 171: 157-211.
- Bedding, R.A. & A.S. Molyneux.** 1982. Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). *Nematologica* 28: 354-359.
- Cagnolo, S.R.; Y.M. Donari. & J.A. Di Rienzo.** 2004. Existence of infective juveniles in the offspring of first- and second- generation adults of *Steinernema rarum* (OLI strain): evaluation of their virulence. *Journal of Invertebrate Pathology* 85: 33-39.
- Cagnolo, S.R. & F. Carranza.** 2007. Ocurrence of entomopathogenic nematodos in private properties in Córdoba Capital City, Argentina. *Nematopica* 37: 142.
- Cagnolo, S.R; M. Rivero & W.R. Almirón.** 2007 a. Susceptibilidad de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) al parasitismo por *Steinernema rarum* (OLI) (Nematoda: Steinernematidae) en condiciones de laboratorio. XXXIX Reunión anual de ONTA. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina. p. 39.

- Cagnolo, S.R.; M. Rivero & W.R. Almirón.** 2007 b. Respuesta inmunitaria de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) al parasitismo por nematodos entomopatógenos (Nematoda: Steinernematidae). Actas 5° Jornadas Regionales sobre mosquitos. *Biología Acuática* 23: 54.
- Cagnolo, S.R. & W.R. Almirón.** 2007. Susceptibilidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* al parasitismo por *Steinernema rarum* (Nematoda: Steinernematidae) en condiciones de laboratorio. Actas 5° Jornadas Regionales sobre mosquitos. *Biología Acuática* 23: 43.
- Cagnolo, S.R. & W.R. Almirón.** 2010. Capacidad del nematodo terrestre entomopatógeno *Steinernema rarum* (Rhabditida: Steinernematidae) de parasitar larvas de *Culex apicinus* (Diptera: Culicidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 69: 141-145.
- Calisher, C.H.; T.P. Monath; C.J. Mitchell; M. Sabattini; C.B. Cropp; J. Kerschner; A.R. Hunt & J.S. Lazuick.** 1985. Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. III. Identification and characterization of virus isolated, including new subtypes of Western and Venezuelan equine encephalitis and four new Bunyanviruses (Las Maloyas, Resistencia, Barranqueras and Antequera). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34: 956-965.
- Carranza, F.A.** 2006. Detección de nematodos entomopatógenos en domicilios de la ciudad de Córdoba, Argentina. Tesina. Universidad Nacional de Córdoba, 46 pp.
- Dadd, R.H.** 1971. Size limitations on the infectivity of mosquito larvae by nematodes during filter-feeding. *Journal of Invertebrate Pathology* 18: 246-251.
- Díaz, L.A.; W.R. Almirón; F. Ludueña Almeida; L.I. Spinsanti & M.S. Contigiani.** 2003. Vigilancia del virus encefalitis de San Luis y mosquitos (Diptera: Culicidae) en la provincia de Córdoba, Argentina. *Entomología y Vectores* 10: 551-566.
- Díaz, L.A.; V. Ré; W.R. Almirón; A. Farías; A. Vázquez; M.P. Sánchez-Seco; J. Aguilar; L.I. Spinsanti; B. Koningheim; A. Visintin; A. Tenorio & M.S. Contigiani.** 2006. St. Louis Encephalitis outbreak, Argentina 2005: genotype III, re-emergency. *Emerging Infectious Diseases* 12:1752-1754.
- Di Rienzo, J.A.; F. Casanoves; M.G. Balzarini; L. Gonzalez; M. Tablada & C.W. Robledo.** 2013. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>

- Domínguez, C.M.; F. Ludueña Almeida & W.R. Almirón.** 2000. Dinámica poblacional de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en Córdoba Capital. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 59: 41-50.
- Doucet, M.M.A. de; M.E. Doucet & K. Nienstedt.** 1992. Diferencias inter e intraespecíficas en la capacidad infectiva de poblaciones de *Heterorhabditis* y *Steinernema* aislados en Argentina. *Nematrópica* 22: 237-242.
- Doucet, M.M.A. de; M.B. Miranda; M.A. Bertolotti & K.A. Caro.** 1996. Efficacy of *Heterorhabditis bacteriophora* (strain OLI) in relation to temperature, concentration and origin of the infective juvenile. *Nematrópica* 26: 129-133.
- Doucet, M.M.A. de; M.A. Bertolotti; A.L. Giayetto & M.B. Miranda.** 1999. Host range, specificity, and virulence of *Steinernema feltiae*, *Steinernema rarum*, and *Heterorhabditis bacteriophora* (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 237-242.
- Eiman, M.; M.V. Introini & C. Ripoll.** 2010. Directrices para la prevención y control de *Aedes aegypti*. Dirección de Enfermedades Transmisibles por Vectores - Ministerio de salud de la Nación, 76 pp.
- García del Pino, F.** 1994. Los nematodos entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) presentes en Cataluña y su utilización para el control biológico de insectos. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, 338 pp.
- Gaugler, R. & H.K. Kaya.** 1990. *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press, Boston, 365 pp.
- Grech, M.; A. Visintin; M. Laurito; E. Estallo; P. Lorenzo; I. Rocca; M. Korin; F. Goya; F. Ludueña Almeida & W.R. Almirón.** 2012. New records of mosquito species (Diptera: Culicidae) from Neuquén and La Rioja provinces, Argentina. *Revista de Saúde Pública* 46: 387-389.
- Klein, M.G.** 1990. Efficacy against soil-inhabiting insect pests. pp195-214. En: *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Gaugler, R. & H.K. Kaya (eds). CRC Press. Boca Raton, FLorida, USA.
- Lewis, E.E.; J. Campbell; C.H. Griyn; H. Kaya & A. Peters.** 2006. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biological Control* 38: 66-79.
- Marra, P.P.; S. Griffing; C. Caffrey; A. Kilpatrick; R. Mclean; C. Brand; E. Saito; A.P. Dupuis; L. Kramer & R. Novak.** 2004. West Nile Virus and Wildlife. *BioScience* 54: 393-402.

- M.S.N. (Ministerio de Salud de la Nación).** 2009 a. Informe de la situación epidemiológica de las provincias. Disponible en: http://www.msal.gov.ar/hm/site/Noticias_plantilla.asp?Id=1393.
- M.S.N. (Ministerio de Salud de la Nación).** 2009 b. Plan Nacional para Prevención y Control del Dengue y la Fiebre Amarilla. Disponible en: http://www.msal.gov.ar/dengue/descargas/plan_nacional%20prevencion_control_dengue_f_amarilla.pdf
- Molta, N.B. & W.M. Hominick.** 1989. Dose- and time-response assessments of *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema feltiae* (Nematoda: Rhabditida) against *Aedes aegypti* larvae. *BioControl* 34: 485-493.
- O.P.S. (Organización Panamericana de la Salud).** 2009. Actualización sobre la situación regional del Dengue. OPS. Reporte 10.
- O.P.S. (Organización Panamericana de la Salud).** 2010. Alerta epidemiológica: nuevos casos de Encefalitis de San Luis en ciudad y provincia de Buenos aires, República Argentina. Riesgo de diseminación. Boletín epidemiológico. p. 1-2.
- Paily, k.P & K. Balaraman.** 2000. Susceptibility of ten species of mosquito larvae to the parasitic nematode *Romanomermis iyengari* and its development. *Medical and Veterinary Entomology* 14: 426-429.
- Pandii, W.; S. Maharmart; S. Boonchuen; S. Silapanuntakul & V. Somsook.** 2007. Efficacy of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) against *Culex gelidus* (Diptera: Culicidae) larvae. *Journal of Vector Borne Disease* 4: 24-35.
- Peschiutta, M.L.** 2009. Efecto patogénico de *Heterorhabditis* sp. sobre *Aedes aegypti*. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. 29 pp.
- Petersen, J.J. & O.R. Willis.** 1974. Experimental Release of a Mermithid Nematode to Control *Anopheles* Mosquitoes in Louisiana. *Mosquito News* 34: 316-319.
- Poinar, G.O. Jr. & R. Leutenegger.** 1971. Ultrastructural Investigation of the Melanization Process in *Culex pipiens* (Culicidae) in Response to a Nematode. *Journal Ultrastructure Research* 36: 149-158.
- Poinar, G.O. Jr. & H.N. Kaul.** 1982. Parasitism of the mosquito *Culex pipiens* by the nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal of Invertebrate Pathology* 39: 382-387.

- 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.
- Poinar, G.O. Jr.** 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. pp 23-61. En: *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Gaugler, R. & H.K. Kaya (eds). CRC Press. Boca Raton- Ann Arbor- Boston.
- Rodríguez, J.; I. García García; M. Díaz; I. García Ávila & J.E. Sánchez.** 2003. Efecto patogénico del nematodo parásito *Strelkovimermis spiculatus* en larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus* en condiciones de laboratorio en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 55: 124-5.
- Rodríguez-Rodríguez, J.; I. García García; Z. Menéndez; I. García Ávila; J.E. Sánchez & R. Pérez Pacheco.** 2005. Efecto patogénico de 3 nematodos parásitos en larvas de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio, en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 57: 219-222.
- Rossi, G.C. & W.R. Almirón.** 2004. Clave ilustrada para la identificación de larvas de mosquitos de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina. Fundación Mundo Sano. Serie Enfermedades Transmisibles. Publicación Monográfica 5, 53 pp.
- Rossi, G.C.; E. Lestani & J.M D'Oria.** 2006. Nuevos registros y distribución de mosquitos de la Argentina (Diptera: Culicidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 65: 51-56.
- Sabattini, M.S.; G. Avilés & T.P. Monath.** 1998. Historical, Epidemiological and Ecological aspects of Arboviruses in Argentina: Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae. pp. 113-134. En: *Travassos da Rosa, A.P.A., P.F.C. Vasconcelos & J.F.S. Travassos da Rosa* (eds). An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Belem, Pará, Brasil.
- Sabattini M.** 2010. Importancia actual de los arbovirus en Argentina. *Sitio Argentino de Producción Animal*. 266: 1-4.
- Sambeek, J.V. & A. Wiesner.** 1999. Successful Parasitization of Locusts by entomopathogenic nematodes is correlated with Inhibition of Insect Phagocytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 154-161.
- Santamarina, A. & R.B. González.** 1991. Capacidad infestiva del nematodo *Romanomermis culicivorax* en larvas de mosquitos de la especie *Anopheles albimanus* en condiciones naturales. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 43: 64-70.

- Santamarina, A.M.** 1994. Actividad parasitaria de *Romanomermis iyengari* (Nematoda, Mermithidae) en criaderos naturales de larvas de mosquitos. *Miscellanea Zoológica* 17: 59-65
- Santamarina Mijares, A.; R. Pérez-Pacheco & S.H. Martínez.** 2000. Susceptibilidad de las larvas de *Aedes aegypti* al parasitismo por *Romanomermis culicivorax* en condiciones de laboratorio y de campo en Oaxaca, México. *Revista Panamericana de Salud Pública* 8: 299-304.
- Sardelis, M.R.; M.J. Turell; D.J. Dohm & M.L. O'Guinn.** 2001. Vector Competence of Selected North American *Culex* and *Coquillettidia* Mosquitoes for West Nile Virus. *Emerging Infectious Diseases* 7: 1018-1022.
- Smith, K.** 1999. Factors affecting efficacy. pp 37-43. En: *Optima use of insecticididad nematodes in pest management*. Brunswick, New Jersey Rutgers University.
- Soto Alvarez, V. & A. Santamarina Mijares.** 1996. Demostración de la actividad biolarvicida de *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Afermithidae) en condiciones de laboratorio. Disponible en: http://www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-2221996012000003&lng=es&nrm=iso.
- Spinsanti, L.; A. Basquiera; S. Bulacio; S. Kim; V. Somale; V. Ré; D. Rabbat; A. Zarate; J. Zlocowski; C. Quiroga; M.S. Contigiani & S. Palacio.** 2003. St. Louis encephalitis in Argentina: the first case reported in the last seventeen years. *Emerging Infectious Diseases* 9: 271-273.
- Spinsanti, L.; L.A. Díaz; N. Glatstein; S. Arselan; M.A. Morales; A. Farias; C. Fabbri; J. Aguilar; V. Ré; M. Frías; W.R. Almirón; E. Hunsperger; M. Siirin; A. Travassos da Rosa; R. Tesh; D. Enría & M. Contigiani.** 2008. Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005. *Journal of Clinical Virology* 42: 27-33.
- Stein, M.; G.I. Oria; W.R. Almirón & J.A. Willener.** 2005. Fluctuación estacional de *Aedes aegypti* en Chaco, Argentina. *Revista de Saúde Pública* 39: 559-64.
- Stock, S.P. & N.B. Camino.** 1996. Nematodos Entomopatógenos. pp 105-118. En: *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*. R.E. Lecuona (ed). Talleres gráficos Mariano Mas. Buenos Aires, Argentina.
- T.D.R. (Research and Training in Tropical Diseases).** 1993. Tropical disease research progress 1991-1992: eleventh programme report of the TDR. WHO: Geneva.

- Turell, M.J.; D.J. Dohm; M.R. Sardelis; M.L. O'Guinn; T.G. Andreadis & J.A. Blow.** 2005. An Update on the Potential of North American Mosquitoes (Diptera: Culicidae) to Transmit West Nile Virus. *Journal of Medical Entomology* 42: 57-62.
- Vezzani, D. & A.E. Carbajo.** 2008. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: current knowledge and future directions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103: 66-74.
- Visintin, A.M.; M. Laurito; L.A. Diaz; G. Benítez Musicant; C. Cano; R. Ramírez & W.R. Almirón.** 2009. New records of mosquito species (Diptera: Culicidae) for central and Cuyo regions in Argentina. *Journal of the American Mosquito Control Association* 25: 208-209.
- W.H.O. (World Health Organization).** 2009. Dengue and Dengue hemorrhagic fever. En: World Health Organization (ed). Fact sheet 117. Ginebra: WHO. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/print.html>.
- Zinser, M.; F. Ramberg & E. Willot.** 2004. *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) as a potential West Nile virus vector in Tucson, Arizona: Blood meal analysis indicates feeding on both humans and birds. *Journal of Insect Science* 4: 1-3.
- Zohdy, N.M.; M.M. Shamseldean; E.M. Abd-El-Samie & H.M. Hamama.** 2013. Efficacy of the Steinernematid and Heterorhabditid nematodes for controlling the mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Journal of Mosquito Research* 3: 33-44.