

Producción masiva de *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) y su aplicación en criaderos de anofelinos en Boa Vista (Roraima), Brasil

Alberto Santamarina Mijares¹ y Antonio Carlos Bellini²

RESUMEN

Para desarrollar la producción masiva del nemátodo *Romanomermis iyengari* Welch, se llevó a cabo el diseño y montaje de una bioplanta en las instalaciones de la Universidad Federal del Estado de Roraima, Brasil, tras un convenio con la Secretaría de Salud del mencionado estado. El objetivo de este trabajo fue establecer el proceso básico de cría masiva del parásito para su posterior aplicación en criaderos de anofelinos. Se obtuvieron 68 cultivos por cada ciclo de siete días, con un total de 272 cultivos por mes. Antes de los tratamientos de campo se realizaron pruebas de laboratorio en las que se comprobó la gran susceptibilidad de las larvas de anofelinos a la infestación por *R. iyengari*, con tasas de parasitismo de 71 a 98%. Para evaluar la capacidad parasitaria de *R. iyengari* en condiciones de campo, se seleccionaron 12 criaderos naturales de anofelinos, con áreas que oscilaron entre 50 y 450 m², en los que se observó la presencia de larvas de mosquitos de las especies *Anopheles albitarsis* Lynch-Arribálzaga y *Anopheles rondoni* Neiva-Pinto, con densidades de 34 a 66 larvas/m². Para la dispersión del biolarvicida en los 12 criaderos se utilizó una bomba costal manual de fabricación nacional a una presión de dos atmósferas y se aplicó una dosis de 2 000 preparásitos/m². Siete días después de los tratamientos se observó una marcada reducción (85 a 97%) de las poblaciones de anofelinos. Los resultados obtenidos demostraron la posibilidad de utilizar *R. iyengari* para controlar las poblaciones larvarias de ambas especies de anofelinos.

El estado de Roraima, situado en el extremo septentrional de Brasil, tiene clima tropical, con una temperatura media de 27 °C y un régimen de precipitaciones entre abril y septiembre que permite la formación de numerosos criaderos en los que proliferan masiva-

mente las larvas de anofelinos. Durante los meses de octubre a marzo (época seca), los criaderos anteriormente formados se estabilizan. Más de 60% de la superficie de Brasil está sujeta a la malaria, que en el estado de Roraima es transmitida por *Anopheles darlingi* Root, cuyos criaderos funcionan como focos permanentes en la época seca, y por *Anopheles albitarsis* Lynch-Arribálzaga, que es más abundante en la época de lluvias, cuando se amplían sus criaderos. La mayoría (95%) de los casos de malaria registrados en Brasil ocurren en la Amazonía Legal (1).

En el estado de Roraima, a pesar de los esfuerzos de vigilancia y control, en 1995 se registraron más de 39 000 casos de malaria, lo cual representa el mayor índice parasitario anual del país (150,9/1 000 habitantes) y revela el impacto de la enfermedad en la población. En 1996, a pesar de la disminución del número de casos de malaria en 10,3%, el estado de Roraima siguió registrando el mayor índice parasitario anual del país: 143/1 000 habitantes (Fundación Nacional de Salud, datos no publicados).

Durante cuatro décadas se ha estado utilizando el DDT en la lucha contra

¹ Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", La Habana, Cuba. Toda la correspondencia debe ser enviada a Alberto Santamarina Mijares, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", Autopista Novia del Mediodía km 6, e/ Autopista Nacional y Carretera Central, La Lisa, C.P. 11500, Ciudad de la Habana, Cuba. Correo electrónico: santamarina@ipk.sld.cu

² Secretaría de Estado de Salud, Boa Vista, Roraima, Brasil.

los anofelinos (2). Su uso excesivo, al igual que el de otros insecticidas eficaces contra larvas y mosquitos adultos, como los organofosforados, carbamatos y piretroides, ha tenido como consecuencias la toxicidad para los humanos, la persistencia en el ambiente y la aparición de resistencia en los insectos vectores (3). Por ello se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas ecológicamente más asimilables para el control de las plagas de vectores y cuyas acciones sean más efectivas y duraderas (4).

El control biológico, basado en la utilización de agentes naturales para la reducción de los vectores de enfermedades humanas y animales, ha constituido en los últimos años una de las alternativas de mayor importancia en los programas de lucha antivectorial. Algunas especies de nemátodos de la familia Mermithidae han demostrado ser eficaces en el control de las larvas de mosquitos en condiciones de laboratorio y de campo (5-7). Estudios realizados con la especie *Romanomermis iyengari* Welch han evidenciado que este nemátodo es capaz de reducir las altas densidades poblacionales de larvas de mosquitos de los géneros *Anopheles*, *Culex* y *Aedes* en condiciones de campo (8-10).

El estado infectivo (preparasitario) de este mermitido es de corta vida y debe encontrar un hospedero adecuado (larva de mosquito) en las 72 a 96 horas siguientes a la eclosión de los huevos. El preparásito penetra en la larva perforando la cutícula con su estilete. Después de un desarrollo parasitario de cinco a seis días a una temperatura de 29 °C en el interior del hospedero, emergen de las formas posparasitarias, que mata a las larvas hospederas en estadio IV de desarrollo. Las formas posparasitarias solo requieren un sustrato húmedo para mudar y reproducirse.

R. iyengari ha sido utilizado con éxito contra varias especies de anofelinos. Los resultados de algunas investigaciones han mostrado elevadas tasas de parasitismo (85 a 100%) con dosis de aplicación de 2 000 preparásitos/m² (11). Otros estudios de campo han permitido comprobar la efectividad de

R. iyengari para regular las poblaciones de larvas de mosquitos de diversas especies (12) y su capacidad de establecimiento y reciclaje después de la aplicación (13).

Para utilizar *R. iyengari* en el tratamiento de criaderos naturales de larvas de anofelinos fue necesario establecer previamente la producción masiva del parásito. En el presente trabajo se describen los resultados obtenidos en la producción masiva de *R. iyengari* y su aplicación en 12 criaderos naturales de *Anopheles rondoni* Neiva-Pinto y *A. albitarsis* en el municipio de Boa Vista (Roraima), Brasil.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para desarrollar la producción masiva de *R. iyengari* se llevó a cabo el diseño y montaje de una bioplanta en las instalaciones de la Universidad Federal del Estado de Roraima, tras un convenio con la Secretaría de Salud del mencionado estado. El programa se desarrolló entre el 20 de abril y el 20 de agosto de 1998 y estuvo destinado a la obtención de los parásitos necesarios para el tratamiento inicial de un área de 3 488 m² de criaderos de anofelinos.

Para obtener la biomasa de nemátodos necesaria se formaron 447 grupos, cada uno con 1 200 larvas de mosquitos de la especie *Culex quinquefasciatus* Say en estadio II de desarrollo, que fueron expuestos a 2 682 000 preparásitos infectivos de *R. iyengari*, en una proporción de cinco preparásitos por larva. Con este fin, previamente se inundaron con agua destilada ocho cultivos que contenían huevos de *R. iyengari*, con el objetivo de inducir la eclosión de los huevos y la emergencia de las formas infectivas. Tres horas después se recolectó y determinó el volumen de inóculo (agua de los cultivos que contenían los preparásitos infectivos). Mediante el método de dilución volumétrica (14) se calculó que el inóculo contenía un total de 4 millones de preparásitos infectivos y se prepararon las dosis de aplicación de 6 000 preparásitos por cada grupo de 1 200 larvas de mosquitos. La infestación de las larvas se realizó con una pipeta de

25 mL en depósitos plásticos de 44 × 37 × 7 cm que contenían, cada uno, 3 500 mL de agua corriente con pH 5,5. Siete días después de la infestación, una vez que las larvas se encontraban en estadio IV, se trasladaron a ocho tamicas de 50 × 30 × 5 cm, forradas con tela de malla, que se colocaron en depósitos plásticos de 60 × 40 × 7 cm con agua para proceder a la recolección de los nemátodos posparasitarios tras la emergencia de las larvas hospederas. Una vez concentrada la biomasa de nemátodos, fueron lavados con agua destilada. Para su siembra se utilizaron agujas entomológicas ligeramente curvas en su extremo distal, con las cuales se depositaron los nemátodos hembras y machos en recipientes plásticos de 30 × 20 × 10 cm que contenían una capa de 3 cm de arena de río lavada y esterilizada y una capa de agua destilada de 2 mm para facilitar el descenso de los nemátodos al fondo de los cultivos. Finalmente el agua fue decantada y los cultivos ligeramente húmedos fueron cubiertos herméticamente y almacenados durante 6 semanas a temperatura ambiente.

Antes de los tratamientos de campo se realizaron pruebas de laboratorio para determinar la susceptibilidad de las larvas de *A. albitarsis* y *A. rondoni* al parasitismo por *R. iyengari*, así como el efecto de las aguas de los criaderos sobre la viabilidad de los preparásitos. Con este fin, en criaderos del municipio de Boa Vista se recolectaron 800 larvas de ambas especies de anofelinos en estadio I-IV que fueron trasladadas al laboratorio y distribuidas en cuatro grupos según su estadio de desarrollo. Por cada estadio se formaron 3 grupos de 50 larvas cada uno, con un total de 12 grupos y 600 larvas. Las larvas se colocaron en depósitos plásticos de 60 × 40 × 7 cm, en aguas de los criaderos con pH 7 y conductividad de 1 µS. Dos cultivos de *R. iyengari* fueron inundados con agua destilada, calculándose por el método de dilución volumétrica (14) que contenían un total de 950 000 preparásitos. Con una pipeta de 25 mL se aplicó una dosis de 250 preparásitos a cada grupo de 50 larvas (razón 5:1). Un grupo de 50 larvas en estadio II no expuestas a los preparási-

tos sirvió como grupo de control. Transcurridas 72 horas, en cada grupo se tomaron muestras de 25 larvas que fueron disecadas y examinadas bajo un microscopio estereoscópico para determinar la infestación media (número medio de parásitos por larva) y la tasa de parasitismo (número de larvas parasitadas dividido por el número de larvas examinadas y multiplicado por 100). También se recolectaron en diferentes criaderos naturales muestras de larvas de anofelinos cuyo examen reveló la ausencia de parasitismo natural.

La aplicación de *R. iyengari* en los criaderos naturales se realizó entre el 23 de julio y el 12 de agosto de 1998. Las condiciones climáticas que se observaron en estos meses se caracterizaron por altas temperaturas (33 a 36 °C durante el día), 68 a 75% de humedad relativa y fuertes precipitaciones, las cuales, junto con la topografía del terreno y la vegetación local, contribuyeron a la formación de numerosas masas de agua que representan potenciales criaderos naturales y hábitats para la reproducción masiva de anofelinos, en los que las densidades poblacionales larvarias alcanzan su valor máximo durante la época seca (octubre a marzo), o al final de la misma si existe suficiente agua disponible.

Para estudiar los efectos de *R. iyengari* sobre las larvas de anofelinos se seleccionaron 13 criaderos naturales localizados en un área de labrado a 25 km de la ciudad de Boa Vista, capital del estado de Roraima. Antes del tratamiento se procedió a la caracterización ecológica y al estudio entomológico de los criaderos. Para tratar 12 criaderos con un área total de 3 488 m² se utilizaron 25 cultivos de nemátodos producidos en la bioplanta, que fueron inundados con agua destilada para la obtención de los preparásitos infectivos. Mediante dilución volumétrica (14), se calculó el número de preparásitos infectivos (13 millones) proveniente del inóculo de los cultivos (26 litros). Las diluciones finales se realizaron antes de las aplicaciones, para lo cual se utilizó el agua de los mismos criaderos. Los preparásitos infectivos se aplicaron directamente en toda la superfi-

cie de los criaderos con una bomba costal manual de fabricación nacional (Brasil), a una presión de dos atmósferas y a una dosis de 2 000 preparásitos/m². La temperatura del agua de los criaderos en el momento de las aplicaciones varió entre 35 y 37 °C. Como control se tomó un criadero con un área de 250 m² que no fue tratado con *R. iyengari*.

En cada criadero, 72 horas después de los tratamientos, se recolectaron muestras de 100 larvas de todos los estadios que fueron disecadas y examinadas con agujas entomológicas bajo un microscopio estereoscópico para determinar la infestación media y la tasa de parasitismo. Siete días después de las aplicaciones se recolectaron muestras de larvas en cada criadero para determinar los porcentajes de reducción de larvas. Para determinar la abundancia de larvas de mosquito y la presencia de insectos acuáticos en cada criadero se utilizó un colector de larvas de 20 cm de diámetro y 20 cm de profundidad, con un mango de 2 m de longitud (15).

Los valores de la infestación media de las larvas examinadas tanto en los experimentos de laboratorio como en los estudios de campo no presentaron distribución normal, por lo que fueron sometidos a transformación cuadrática. Dichas medias fueron compara-

das entre los diferentes estadios larvales en los experimentos de laboratorio y entre los diferentes criaderos en los estudios de campo mediante análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Duncan. Para calcular los porcentajes de reducción de larvas en cada criadero se utilizó la siguiente fórmula: [(valor final – valor inicial)/valor inicial] × 100, donde los valores inicial y final son, respectivamente, los registrados antes y 7 días después de las aplicaciones de *R. iyengari*.

RESULTADOS

El proceso básico de cría masiva permitió obtener 68 cultivos por cada ciclo de 7 días, con un total de 272 cultivos por mes. Los lotes de cultivos de nemátodos almacenados durante 6 semanas produjeron el inóculo necesario, con un rendimiento de aproximadamente 250 000 preparásitos por cultivo.

En el cuadro 1 se muestran las características ecológicas de los 12 criaderos tratados y del criadero de control. Tenían áreas de 50 a 450 m² y una profundidad de 10 a 29 cm, contenían aguas limpias de lluvia con pH de 5 a 5,5 y conductividad de 1 µS, y poseían una variada vegetación flotante o emergente, con hojas aéreas, como *Pis-*

CUADRO 1. Características ecológicas de un criadero de control y de 12 criaderos naturales de larvas de *Anopheles albiparvus* y *A. rondoni* en estadio I-IV tratados con *Romanermis iyengari*. Boa Vista (Roraima), Brasil, 1998

Criadero ^a	Área (m ²)	Vegetación	pH	Profundidad (cm)	Temperatura (°C)
1	60	Algas verdes y jacintos de agua	5	10	35
2	72	Algas verdes y <i>Pistia stratiotes</i>	5	20	35
3	320	Algas verdes y <i>Pistia stratiotes</i>	5	25	36
4	400	Algas verdes y jacintos de agua	5	15	35
5	50	Algas verdes y <i>Eichornia crassipes</i>	5	15	36
6	75	Algas verdes y <i>Eichornia crassipes</i>	5,5	20	36
7	380	Algas verdes y <i>Pistia stratiotes</i>	5	20	36
8	420	Algas verdes y <i>Eichornia crassipes</i>	5,3	25	36
9	421	Algas verdes y <i>Eichornia crassipes</i>	5,2	28	37
10	405	Algas verdes y <i>Pistia stratiotes</i>	5	29	36
11	435	Algas verdes y <i>Eichornia crassipes</i>	5	28	35
12	450	Algas verdes y <i>Eichornia crassipes</i>	5	29	35
Control	250	Algas verdes y jacintos de agua	5,4	27	35

^a Todos los criaderos tenían una conductividad de 1 µS.

CUADRO 2. Infestación media y tasa de parasitismo en larvas de *Anopheles albitarsis* y *A. rondoni* en estadio I-IV tras la aplicación de *Romanomermis iyengari* a dosis de 5 preparásitos por larva en el laboratorio. Boa Vista (Roraima), Brasil, 1998

Estadio larvario	Infestación media ^a	Tasa de parasitismo ^b (%)
I	4,4 ^c	98
II	4,2 ^c	96
III	2,7 ^d	85
IV	1,3 ^e	71

^a Número medio de parásitos por larva.

^b (Número de larvas parasitadas/número de larvas examinadas) × 100.

^c Medias que no difieren significativamente entre sí ($F = 0,8$; $P = 0,083$).

^d Media significativamente diferente de las marcadas con ^c ($F = 45,2$; $P = 0,004$).

^e Media significativamente diferente de las marcadas con ^c y ^d ($F = 44,1$; $P = 0,005$).

tia stratiotes Linnaeus y *Eichornia crassipes* Mart, además de algas verdes, jacintos de agua y detritos orgánicos flotantes. El estudio entomológico reveló la presencia de larvas de *A. albitarsis* y *A. rondoni* en estadio I-IV, con densidades que oscilaron entre 34 y 66 larvas/m². En los criaderos 3, 4, 6, 8 y 10 (grupo A) se observó un predominio de larvas en los estadios más jóvenes (I-III) en el momento de las aplicaciones; en los demás criaderos (grupo B: 1, 2, 5, 7, 9, 11 y 12), no predominó ningún estadio larvario. En cada criadero había también numerosos insectos acuáticos componentes de la fauna acompañante de las larvas de mosquitos, tales como estados inmaduros y formas adultas del orden Hemiptera (*Belostoma apache* Kirk y *Pelocoris femoratus* Barber), orden Odonata (estados inmaduros y formas adultas de los subórdenes Anisoptera y Zygoptera) y orden Coleoptera (ninfas y formas adultas de las especies *Thermoneutes circumscripta* Latreille y *Tropisternus lateralis* Fabricius).

Las pruebas de laboratorio revelaron altas medias de infestación y altas tasas de parasitismo en las larvas de ambas especies de anofelinos en estadio I a IV. La infestación media de las larvas disminuyó significativamente de los estadios I y II al III ($F = 45,2$; $P = 0,004$) y del III al IV ($F = 44,1$; $P = 0,005$)

(cuadro 2). Las tasas de parasitismo encontradas fueron indicativas del número de larvas de mosquito suprimidas por el tratamiento, como larvas infectadas que nunca progresaron a la fase de pupa. Estos resultados indican que las aguas de los criaderos con valores de pH 7 y conductividad de 1 μ S que se utilizaron en los experimentos de laboratorio no tuvieron un efecto adverso detectable sobre la viabilidad e infectividad de las formas preparasitarias de *R. iyengari*. El examen de las muestras de larvas de anofelinos recolectadas en los criaderos naturales no mostró parasitismo natural.

Cuando los 12 criaderos se trataron con una dosis de 2 000 preparásitos/m², la infestación media alcanzó valores entre 3,1 y 5,0, con tasas de parasitismo de 89 a 100% (cuadro 3). Los valores de la infestación media en el grupo de criaderos con predominio de larvas jóvenes (grupo A) fueron significativamente ($F = 43,1$; $P = 0,004$) superiores a los de los criaderos del grupo B. Las mayores medias de infestación ocurrieron en los estadios más jóvenes (I, II y III) y en los cinco criaderos del grupo A se registraron tasas de parasitismo iguales o superiores a

CUADRO 3. Infestación media y tasa de parasitismo en larvas de *Anopheles albitarsis* y *A. rondoni* en 12 criaderos naturales tratados con *Romanomermis iyengari* a dosis de 2 000 preparásitos/m². Boa Vista (Roraima), Brasil, 1998

Criaderos	Infestación media ^a	Tasa de parasitismo ^b (%)
1	3,4	90
2	3,2	89
3	4,7 ^c	98
4	4,9 ^c	99
5	3,4	90
6	4,8 ^c	98
7	3,4	92
8	4,7 ^c	97
9	3,3	91
10	5,0 ^c	100
11	3,1	92
12	3,4	91

^a Número medio de parásitos por larva.

^b (Número de larvas parasitadas/número de larvas examinadas) × 100.

^c Infestación media significativamente superior ($F = 43,1$; $P = 0,004$) a la de los demás grupos.

97%. Las larvas en estadio IV demostraron ser menos susceptibles al ataque de los preparásitos invasores de *R. iyengari*.

El muestreo realizado en los 12 criaderos 7 días después de los tratamientos mostró una disminución aguda de la abundancia de larvas, con una reducción de la densidad larvaria de 94 a 97% en los criaderos del grupo A y de 85 a 89% en los del grupo B. En el criadero de control, por el contrario, se observó un ligero aumento (7%) de la población de larvas (cuadro 4). Los muestreos realizados en los criaderos después de las aplicaciones mostraron la presencia de un gran número de insectos acuáticos. Las características físico-químicas de las aguas de los criaderos no tuvieron efectos adversos sobre la actividad de los preparásitos infectivos y la presencia de vegetación no obstaculizó el contacto de los preparásitos infectivos con las larvas de anofelinos.

DISCUSIÓN

La bioplanta de nemátodos localizada en las instalaciones de la Universidad Federal del Estado de Roraima, cuyo montaje tuvo un costo de US\$ 4 500, permitió desarrollar la producción masiva de *R. iyengari*. Los cultivos que se utilizaron para las pruebas tanto de laboratorio como de campo se inundaron a las 6 semanas de almacenamiento, con un alto rendimiento en el número de preparásitos infectivos (250 000/cultivo). Otros estudios han documentado también el gran rendimiento y bajo costo de la producción masiva del nemátodo *R. culicivora* (14, 16).

Una vez que el equipamiento necesario ha sido instalado y se domina la técnica de producción de nemátodos, los únicos gastos que supondría la cría masiva serían el salario de los técnicos, el costo de manutención de los animales (pollos, cobayos, etc.) para la toma de sangre por las hembras adultas de los mosquitos en el insectario y la alimentación de las larvas durante los procesos de infestación (14). Aunque en la literatura consultada no hemos

CUADRO 4. Porcentajes de reducción de larvas de anofelinos en el criadero de control y en los 12 criaderos tratados, siete días después de la aplicación de *Romanermis iyengari*. Boa Vista (Roraima), Brasil, 1998

Criaderos	Antes del tratamiento		Después del tratamiento		Cambio ^b (%)
	DL ^a	Número de larvas	DL	Número de larvas	
1	34	2 040	5	300	-85
2	48	3 456	7	504	-85
3	66	21 120	2	640	-97
4	33	13 200	2	800	-94
5	66	3 300	8	400	-88
6	66	4 950	4	300	-94
7	66	25 080	7	2 660	-89
8	48	20 160	2	840	-96
9	53	22 313	6	2 526	-89
10	51	20 655	2	810	-96
11	60	26 100	7	3 045	-88
12	49	22 050	6	2 700	-88
Control	58	14 500	62	15 500	7

^a DL = densidad larvaria (número de larvas/m²).

^b Cambio porcentual calculado con la fórmula: [(valor final - valor inicial)/valor inicial] × 100, donde los valores inicial y final son, respectivamente, los registrados antes y 7 días después de la aplicación de *R. iyengari*.

encontrado datos sobre el costo de aplicación de los biolarvicidas *R. iyengari* o *R. culicivora*, ello depende de la frecuencia de aplicación. Dos estudios demostraron que *R. iyengari* persistió al menos durante 4 y 5 meses consecutivos, de agosto a diciembre de 1991 y de septiembre a diciembre de 1991, respectivamente, después de una aplicación por cada criadero (10, 17). Algunas observaciones realizadas 8 meses después en 9 de los 12 criaderos tratados en el estado de Roraima indicaron la presencia de reducidas poblaciones de larvas de anofelinos parasitadas por *R. iyengari* (A. Martínez, comunicación personal, 1999).

En el control de las larvas de mosquito se han utilizado otros productos, como la capa de aceite monomolecular, pero con efectos indeseables sobre la fauna acompañante (insectos acuáticos, peces larvivoros, etc.) del vector. Los larvicidas reguladores del crecimiento, incluidas las hormonas juveniles, también han sido empleados contra diferentes especies de insectos. La hormona juvenil metopreno o altosid es un compuesto comercializado en varias formulaciones, cuyo mecanismo radica en el bloqueo de la metamorfosis del insecto, frente al cual se ha descrito resistencia en *Culex quinquefasciatus* Say y *Culex pipiens fatigans* Say (18). Otros

reguladores como el dimilín (diflubenzuron o TH-6040) y otros ecdisoides son venenos que actúan selectivamente en los insectos, bloqueando los mecanismos de la écdisis o muda. Estos productos, además de su elevado costo, presentan otras limitaciones porque no penetran con facilidad la cutícula del insecto y, por tanto, no han encontrado aplicación práctica en el control de insectos (19). El *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* De Barjac, aunque constituye un larvicida de acción rápida y es altamente específico contra las larvas de mosquito, con poco o ningún impacto ambiental adverso, presenta un limitado poder residual tras su aplicación (10 a 15 días, dependiendo de su formulación). El temefós es un larvicida químico que se ha usado durante 15 a 30 años para el control de las larvas de mosquito, principalmente *Aedes aegypti* Linnaeus. Su efectividad y poder residual (uno a dos meses) han permitido incluirlo en los programas de lucha antivectorial, pero se ha descrito resistencia de *A. aegypti* al temefós en 16 países, desde Suriname en Sudamérica hasta las Bahamas, a través de las islas del Caribe (20).

Las pruebas de laboratorio para determinar la capacidad infectiva de los preparásitos de *R. iyengari* en larvas de anofelinos mostraron una susceptibili-

dad comparativamente similar en los estadios I y II. Estas formas más jóvenes resultaron más vulnerables al ataque de los preparásitos de *R. iyengari*. Las larvas en estadios más avanzados (III y IV) demostraron ser algo menos susceptibles al parasitismo, hecho que podría estar relacionado con el espesor de la cutícula. Las larvas en estadios más jóvenes poseen una menor formación de quitina, lo que implica que la cutícula sea más débil, haciéndolas mucho más sensibles a la invasión por los preparásitos. Otros autores (21) han descrito observaciones similares al exponer larvas de mosquitos en sus diferentes estadios de desarrollo a las formas infectivas del nemátodo en condiciones de laboratorio. Según estos autores, las larvas en estadio I y II mostraron la misma susceptibilidad a la infestación, mientras que las larvas en estadio III y IV mostraron una susceptibilidad menor.

Las aguas de los criaderos utilizadas en condiciones de laboratorio no tuvieron efectos negativos sobre la infestación de las larvas de anofelinos por *R. iyengari*. Los valores de pH y conductividad de estas aguas estuvieron dentro de los intervalos descritos por otros autores para la utilización de este mermítico (8). Las tasas de parasitismo obtenidas en los 12 criaderos tratados con *R. iyengari* fueron muy elevadas, aunque las mayores tasas se registraron en los criaderos del grupo A (3, 4, 6, 8 y 10), hecho que se explica por el mayor predominio de los estadios larvarios más jóvenes. Sin embargo, en los criaderos del grupo B (1, 2, 5, 7, 9, 11 y 12), aunque la composición larvaria era diferente, sin predominio de ninguno de los estadios, las tasas de parasitismo también fueron elevadas. Estos resultados de campo, previamente corroborados por las pruebas de laboratorio, indicaron que los mejores resultados se pueden obtener al realizar las aplicaciones de nemátodos en criaderos en los que predominan poblaciones jóvenes de larvas de mosquitos. Aunque el parasitismo ocurrió en los 12 criaderos, los estadios larvarios más jóvenes fueron los más altamente infectados, hecho que puede ser atribuido no solo a las características del

espesor de la cutícula, sino además a la conducta particular de las larvas de anofelinos de asumir una posición paralela a la superficie del agua, que aumenta la probabilidad de contacto con las formas infectivas del nemátodo, que también tienden a concentrarse en la superficie del agua. En liberaciones experimentales realizadas en criaderos naturales también se ha descrito que las larvas de anofelinos muestran mayor susceptibilidad a la invasión por las formas parasitarias jóvenes de *R. iyengari* (10).

Las poblaciones de anofelinos muestreadas 72 horas y 7 días después de las aplicaciones permitieron observar la presencia de numerosos insectos acuáticos como odonatos, hemípteros y coleópteros en estados ninfales y adultos, lo cual demuestra la inocuidad de este agente biológico para la fauna acompañante y su alta especificidad de acción para las larvas de mosquitos. *R. iyengari* demostró ser tan seguro para el hombre y otros organismos como otros nemátodos mermítidos utilizados en el control de vectores, como *R. culicivox* (22). La profundidad de los criaderos y el pH, conductividad y temperatura de las aguas estuvieron dentro de los recorridos aceptables para el uso de este parásito (8) y no afectaron adversamente a las tasas de infestación obtenidas. La vegetación presente en los criaderos tratados, aunque no abun-

dante, tampoco interfirió con las posibilidades de contacto entre los preparásitos y las larvas de anofelinos. Otros autores han indicado (5) que la densa vegetación presente en algunos sitios tratados probablemente contribuya a los bajos niveles de parasitismo, en comparación con otros sitios naturales con escasa vegetación, en los cuales la incidencia del parasitismo fue elevada. Aunque en la literatura consultada no se describe el parasitismo por *R. iyengari* en larvas de *A. albitarsis* y *A. rondoni* en laboratorio y campo, los resultados obtenidos indican que ambas especies de anofelinos son hospederos muy atractivos, con una elevada susceptibilidad al ataque de los preparásitos. Una dosis de 2 000 preparásitos/m² resultó altamente efectiva, produciendo una marcada reducción de las poblaciones de larvas de *A. albitarsis* y *A. rondoni* en los 12 criaderos tratados. En el criadero de control se observó un ligero incremento de las larvas en estadios más jóvenes, hecho que se atribuyó a la eclosión de huevos y a la emergencia de nuevas larvas (23).

Los resultados obtenidos indicaron que el nemátodo *R. iyengari* fue efectivo como agente de lucha biológica para el control de las poblaciones de larvas de *A. albitarsis* y *A. rondoni* en el estado de Roraima, Brasil.

Las conclusiones derivadas de este estudio son las siguientes:

1. El proceso de cría masiva de *R. iyengari* que se desarrolló en la bio-planta localizada en las instalaciones de la Universidad Federal del Estado de Roraima permitió la obtención a bajo costo del inóculo necesario para el tratamiento de los 12 criaderos.
2. La susceptibilidad al parasitismo por *R. iyengari* fue mayor en los primeros estadios larvarios (I y II) de *Anopheles*.
3. La aplicación de una dosis de 2 000 preparásitos/m² de superficie tuvo como resultado la parasitación de las larvas en estadio I-IV en los 12 criaderos tratados.
4. Las larvas de *A. albitarsis* y *A. rondoni* fueron altamente susceptibles al parasitismo por *R. iyengari*.
5. Las aplicaciones de *R. iyengari* provocaron una gran reducción (85 a 97%) de las poblaciones de anofelinos en los 12 criaderos.
6. Las evaluaciones anteriores y posteriores al tratamiento demostraron la inocuidad de *R. iyengari* para otros insectos acuáticos, como odonatos, hemípteros y coleópteros.

Agradecimientos. Los autores desean agradecer al Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" su asistencia técnica y a la Secretaría de Salud y a la Universidad Federal del Estado de Roraima el apoyo brindado.

REFERENCIAS

1. Deane LM. A cronologia da descoberta dos transmissores da malária na Amazônia brasileira. Mem Inst Oswaldo Cruz 1989;84(Supl. IV):149-156.
2. Aldridge WN. Insecticides, past, present and future: practice and the understanding of mechanisms. Ann Occup Hyg 1979;22:407-409.
3. Mariconi FA. Insecticidas e seu emprego no combate às pragas. 4a ed. Editora Nobel; 1980.
4. Priest FG. Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. J Appl Bacteriol 1992; 72:357-369.
5. Brown BJ, Platzer GE, Hughes DS. Field trials with the mermithid nematode *Romanomermis culicivox* in California. Mosquito News 1977; 37:603-608.
6. Petersen JJ. Observations on the mass production of *Romanomermis culicivox*, a nematode parasite of mosquitoes. Mosquito News 1978; 38:83-86.
7. Westerdahl BB, Washino RK, Platzer EG. Successful establishment and subsequent recycling of *Romanomermis culicivox* (Mermithidae: Nematoda) in a rice field following postparasite application. Geneva: World Health Organization; 1981. (VBC/81.826).
8. Bheema Rao US, Gajanana A, Rajagopalan PK. A note on the tolerance of the mermithid nematode *Romanomermis* spp. to different pH and salinity. Indian J Med Res 1979;69: 422-427.
9. Santamarina MA, García IA, Rivera JR, Solís AM. Release of *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) to control *Aedes taeniorhynchus* (Culicidae: Diptera) in Punta del Este, Isla de la Juventud, Cuba. J Med Entomol 1996;33:680-682.
10. Santamarina MA. Actividad parasitaria de *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) en criaderos naturales de larvas de mosquitos. Misc Zool 1994;17:59-65.
11. Petersen JJ, Steelman CD, Willis OR. Field parasitism of two species of Louisiana rice field mosquitoes by a mermithid nematode. Mosquito News 1973;33:573-575.
12. Pridantseva EA, Lebedeva NI, Shcherban ZP, Kadyrova MK. An evaluation of the possibility of using *Romanomermis iyengari* Welch mermithids for mosquito control in Uzbekistan. Med Parasitol (Mosk) 1990;1:15-17.
13. Kerwin JL, Washino RK. Recycling of *Romanomermis culicivox* (Mermithidae: Nematoda)

- in rice fields in California, USA. *J Med Entomol* 1985;22:637-643.
14. Petersen JJ, Willis OR. Procedures for the mass rearing of a mermithid parasite of mosquitoes. *Mosquito News* 1972;32:226-230.
 15. Dubitskij AM. Métodos de control biológico de los dípteros hematófagos en la URSS. T 1. Alma Ata: Acad Csi Kaz SSR; 1978.
 16. Petersen JJ, Willis OR, Chapman HC. Release of *Romanomermis culicivorax* for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador. I. Mass production of the nematode. *Am J Trop Med Hyg* 1978;27:1265-1267.
 17. Santamarina MA, García AI, González BR. Valoración de la capacidad infectiva del nemátodo parásito *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) en criaderos naturales de larvas de mosquitos. *Rev Cubana Med Trop* 1993;45:128-131.
 18. Organisation Mondiale de la Santé. Resistance aux pesticides des vecteurs et reservoirs de maladies. Deuxième rapport du Comité OMS d'experts de la biologie des vecteurs et de la lutte antivectorielle. Genève: OMS; 1986.
 19. Ittycheriah PI, Quraishi MS, Marks EP. Effects of ecdysones, juvenile hormone analogs, and 6-oxooctanoic acid on the development of the mosquito *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *Can Entomol* 1974;106:79-85.
 20. Rawlins SC. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. *Pan Am J Public Health* 1998;4:243-251.
 21. Kurihara T, Maeda R. Observations on the development of the nematode parasite *Romanomermis culicivorax* in pupal and adult *Culex pipiens molestus* mosquitoes. *Mosquito News* 1980;40:643-645.
 22. Poinar GO. On the question of human infection by nematodes of the family Mermithidae (Dorylaimida: Adenophora). Geneva: OMS; 1975. (WHO mimeographed document WHO/VBC/75.564-WHO/HELM/75.2).
 23. Petersen JJ, Willis OR. Experimental release of a mermithid nematode to control *Anopheles* mosquitoes in Louisiana. *Mosquito News* 1974 ;34:316-319.

Manuscrito recibido el 26 de marzo de 1999 y aceptado para publicación, tras revisión, el 13 de octubre de 1999.

ABSTRACT

Mass produced *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) applied to anopheline breeding sites in Boa Vista (Roraima), Brazil

In order to begin mass producing the nematode *Romanomermis iyengari* Welch, a bio-processing plant was designed and set up on the grounds of Universidad Federal in the State of Roraima, Brazil, after reaching an agreement with that State's Health Department. The objective of this paper was to establish the basic process for mass breeding the parasite in order to apply it to anopheline breeding sites. Cultures were obtained at a rate of 68 during every seven-day cycle, making for a total of 272 cultures a month. Before treatments were applied in the field, laboratory tests were conducted that showed the great susceptibility of anopheline larvae to infestation by *R. iyengari*, with parasitism rates ranging from 71 to 98%. In order to assess the parasitizing capacity of *R. iyengari* in actual field conditions, 12 natural anopheline breeding sites were chosen, each ranging in size between 50 and 450 m². The species *Anopheles albitarsis* Lynch-Arribálzaga and *Anopheles rondoni* Neiva-Pinto were detected there, at densities that ranged from 34 to 66 larvae/m². The biolarvicide was sprayed in all 12 breeding sites with a domestically manufactured pump set at a pressure of two atmospheres and a dose of 2 000 preparasites/m². Seven days after treatments were performed, anopheline populations were markedly reduced (85 to 97%). Results obtained point to the feasibility of using *R. iyengari* to control larval populations of both species of anophelines.