

DAÑOS PRODUCIDOS POR DOS MICROORGANISMOS NO IDENTIFICADOS EN LAS CELULAS EPITELIALES DEL INTESTINO MEDIO DE *Anopheles albimanus* Weideman.

Por: José Mulett Ch. *

INTRODUCCION

El mosquito *Anopheles albimanus* tiene una amplia distribución en América que va desde el Sur de Estados Unidos hasta los países de Sur América, especialmente los de la parte Norte como Colombia, Venezuela, Perú y Ecuador. (Informe del Departamento de Agricultura U.S.A. 1959).

En nuestro país está presente en la Costa Atlántica, Costa Pacífica, Valle del Río Cauca, Valle del Río Magdalena, Valle del Río Sinú, Llanos Orientales y la Zona Nororiental del país (Sarmiento, G. 1971).

La importancia de *Anopheles albimanus* radica en que es uno de los vectores más potente, importante y efectivo de la malaria en América del Sur especialmente en nuestro país. Actualmente se afronta un grave problema con esta especie de *Anopheles* que consiste en que ha desarrollado una gran resistencia a todos los insecticidas que actualmente se utilizan para su control (Georghiou, G. y C.E. Taylor 1976). Esto ha demostrado la deficiencia del control Químico para este tipo de mosquitos y por lo tanto la necesidad urgente de experimentar otro tipo de control que complemente el control químico.

MATERIALES Y METODOS

Establecimiento de la Colonia de Anofelinos.

Larvas de *Anopheles albimanus* fueron colectados en la ciudad de Buenaventura en febrero de 1978 en el Barrio Cotpuertos. En el laboratorio fueron identificados utilizando la Clave Ilustrada para los Mosquitos Anofelinos de Suramérica Occidental (Gorham, J.R. y Ch. J. Stojanovich 1973). Especímenes de estas muestras fueron enviadas posteriormente al Centro de Investigaciones del Departamento de Agricultura de Estados Unidos para confirmar la identificación de los Anofelinos (Knutson, Li, 1979).

Las larvas se mantuvieron en bandejas metálicas esmaltadas blancas (25 cm. x 15 cm. x 6 cm.) con dos litros de agua; 200 larvas por bandeja, las cuales se mantuvieron tapadas con un vidrio bien limpio para evitar la evaporación y contaminación. Las larvas fueron alimentadas diariamente con pequeñas cantidades de alimento para aves bien molido. Como complemento alimenticio se suministró agua natural rica en protozoarios 2 veces por semana. Las larvas fueron mantenidas a una temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Las pupas se colocaron en cajas de Petri con agua limpia (50 pupas por caja) y fueron transferidas a cajas de anqueo para adultos. Los adultos fueron mantenidos en el laboratorio en cajas construidas de acuerdo con el diseño de Gerberg (1 m x 1 m X 1 m) a una temperatura de $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y a una humedad relativa de 82 ± 3 . Se alimentaron con sacarosa al 100/o colocada en una botella de boca ancha taponada con algodón. Diariamente se introdujo en la caja un curi, inmovilizado en una bolsa de anqueo, por un período de 3 horas para permitir a las hembras la succión de sangre (Ford y Geen, 1972).

Para colectar los huevos se utilizaron cajas de Petri con agua provistas de un papel de filtro en el fondo. Los huevos colectados se colocaron sobre un papel de filtro flotando en la superficie del agua de una bandeja utilizada para la cría normal de larvas.

En el mes de junio de 1980, se inició otra colonia con larvas capturadas en el corregimiento de Córdoba sobre la cercaña del Río Dagua. Estas larvas fueron mantenidas en las mismas condiciones de la colonia de *Anopheles albimanus* que se tenía en el laboratorio.

Las larvas moribundas que se sometieron a estudios citológico en el microscopio electrónico fueron fijadas en Glutaraldehido buffer fosfato al 30/o durante un tiempo de 3 horas 30 minutos. Luego fueron colocadas en una mezcla de fija-

* Profesor, Sección de Entomología, Departamento de Biología, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

dor ósmico con Collidina (Solución de Tetróxido de ósmico al 20/o y Buffer de Collidina en proporción 1:1). Fijados los tejidos se sometieron a un proceso de deshidratación en alcohol de 50o/o, 70o/o, 80o/o, 95o/o y 100o/o en un tiempo de 15 minutos para cada solución de alcohol. La inclusión se hizo tomando los tejidos después del último cambio de alcohol absoluto y sometiéndolos a dos cambios en óxido de propileno con una duración de 20 minutos cada solución.

Posteriormente los tejidos fueron colocados en una mezcla de óxido de propileno y mezcla de Epon-Araldita (Proporción 1x1) durante 30 minutos. Inmediatamente los tejidos fueron colocados en esta misma mezcla pero en proporción de 1x2 (1 parte de óxido de propileno y 2 partes de mezcla de Epon-araldita) durante 30 minutos. Luego los tejidos se colocaron en una mezcla de Epon-araldita durante 30 minutos y por último se llenaron las capsulitas de molde con mezcla de Epon-araldita y los tejidos fueron colocados en el centro con orientación anteroposterior. La polimerización se hizo colocando las capsulitas a temperaturas de 35°C y 45°C por un tiempo de 12 horas para cada temperatura y posteriormente a una temperatura de 60°C durante 24 horas.

Polimerizadas las muestras se hicieron cortes gruesos de una micra en el ultramicrotomo marca Sorval—MT1, utilizando una cuchilla de diamante. Estos cortes fueron coloreados con una mezcla de Azur B - Fucina Básica (1x1). Elegido la parte del tejido para estudio se hicieron cortes delgados de 6000Å los cuales se colorearon con Citrato de Plomo y Urani-acetato al 20/o según la técnica de Reynolds. Las rejillas utilizadas para la observación fueron de 300 mesh y el microscopio electrónico utilizado fue un JEM—7A.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los especímenes de *Anopheles albimanus* Weideman capturados en Buenaventura en el Barrio Colpuertos y que sirvieron de referencia a las condiciones de laboratorios citadas anteriormente tuvieron un ciclo de vida con una duración que se muestra en la tabla No. 1.

Los especímenes de *Anopheles albimanus* Weideman capturados en la población de Córdoba cerca de la margen del Río Dagua y a unos 30 kilómetros de Buenaventura sometidos a las mismas condiciones de cría de los especímenes capturados en Buenaventura y en el mismo laboratorio, mostraron una alta mortalidad. Esto lo podemos observar claramente en la Tabla No.2.

TABLA I

Tiempo de duración para cada uno de los estadios de *Anopheles albimanus* Weideman a una temperatura de 26°C ± 3 y Humedad Relativa de 82 ± 3. (La Humedad Relativa fue determinada con las Tablas de Taylor).

Estadio	Tiempo de Duración
Larvas	14 ± 3 días
Pupas	30 ± 3 días
Adultos	29 días aproximadamente
Huevos	40 ± 6 horas de incubación.

El promedio de mortalidad a través de casi dos años de cría no alcanzó el 30/o.

TABLA II

Porcentaje de mortalidad de las larvas de *Anopheles albimanus* Weideman capturadas en región de Córdoba.

Fecha de Captura	Larvas Capturadas	Larvas Muertas	o/o de Mortalidad
Junio 6 de 1980	200	120	60
Junio 27 de 1980	300	170	56,6
Julio 19 de 1980	150	80	53,3
Agosto 2 de 1980	320	280	87,5
Septiembre 12 de 1980	100	70	70
Octubre 18 de 1980	250	150	60

Promedio de mortalidad 64,56/o

Las larvas que murieron todas eran del 4o. estadio.

Uno de los aspectos que se observó marcadamente en las larvas que morían era la pérdida de movilidad paulatinamente. Las larvas que sobrevivieron tuvieron una longitud similar a la expuesta en la Tabla No.1 para los especímenes capturados en Buenaventura.

Este síntoma de la pérdida del movimiento en forma paulatina indica la presencia de una enfermedad infecciosa.

Al analizar las preparaciones histológicas de cortes del Epitelio del intestino-medio los signos encontrados demostraron esta suposición. En la microfotografía electrónica de la figura No. 1 se observa un corte de epitelio del intestino-medio de una larva sana. Se pueden observar las de condiciones normales del citoplasma. La microfotografía electrónica de la figura No. 2 muestra un corte de Epitelio del intestino-medio donde se observan los daños producidos por la acción lítica del agente infeccioso.

En la microfotografía electrónica de la Figura 3 se puede observar el citoplasma de la célula epitelial completamente destruido y señalado con una flecha se observa el microorganismo flagelado que ha producido el daño. En la microfotografía electrónica de la Figura 4 se observa el microorganismo que ha producido la infección y aquí se puede apreciar sus características estructurales. Presenta dos casquetes, anterior y posterior; en el anterior se observa una flagelo. En su cuerpo celular no se observa núcleo diferenciado lo que indica que es un Procariote y por su tamaño es del grupo de las bacterias.

En la microfotografía electrónica de la Figura No.5 se observan los daños líticos producidos por la acción de la bacteria que se aprecia en el citoplasma de la Célula Epitelial del intestino medio. Esta bacteria es del tipo standard por su estructura y su presencia nos indica que el tipo de enfermedad que esta produciendo es una enfermedad infecciosa mixta, que posiblemente es lo que esta determinando el alto porcentaje de mortalidad.

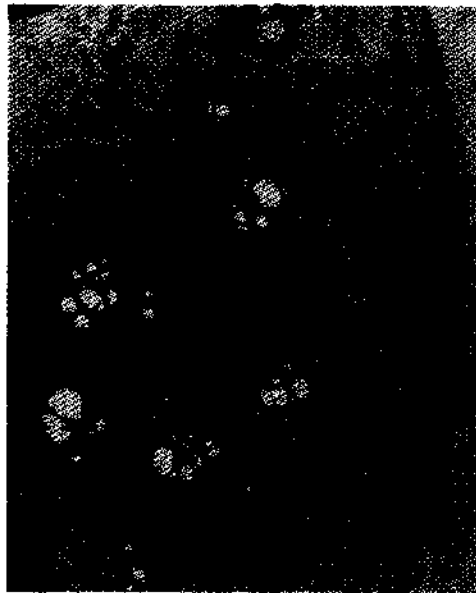


Figura 2.
Microfotografía Electrónica que muestra un corte transversal de una célula infectada del Epitelio del intestino-medio de *Anopheles albimanus*. (Aumento 19500X).

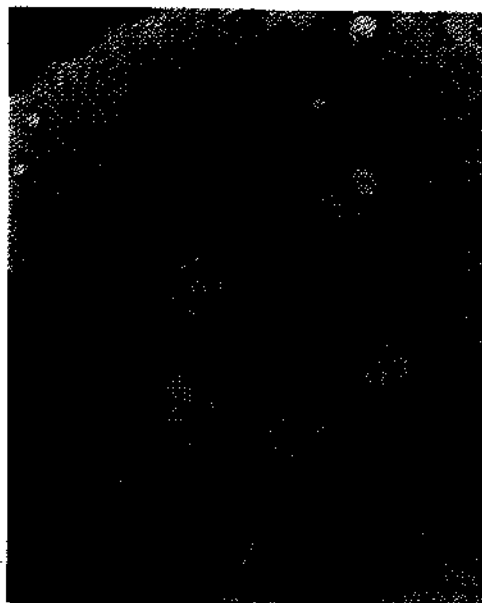


Figura 3.
Microfotografía Electrónica que muestra un corte transversal de una célula del Epitelio del intestino-medio infectado de *Anopheles albimanus*. La flecha muestra el microorganismos que produce el daño. (Aumento 19500X).



Figura 1
Microfotografía Electrónica que muestra un corte transversal de una célula sana del Epitelio del intestino-medio de *Anopheles albimanus*. (Aumento 31750X).

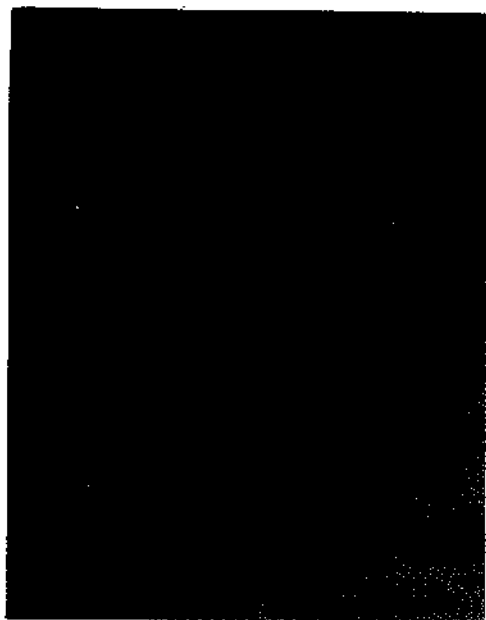


Figura 4.
Microfotografía Electrónica que muestra al microorganismo que produce los daños en el citoplasma de la célula del Epitelio del Intestino-medio de *Anopheles albimanus*. (Aumento 31750X).

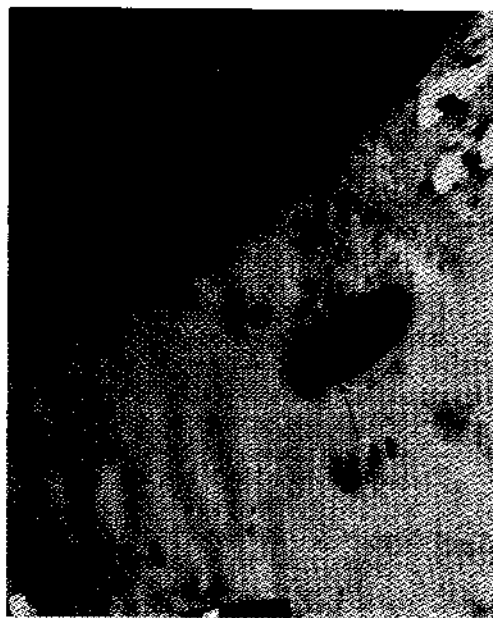


Figura 5.
Microfotografía Electrónica que muestra un corte transversal del citoplasma de una célula del Epitelio del Intestino-medio infectada de *Anopheles albimanus*. La flecha muestra el microorganismo que produce el daño. (Aumento 35000X).

CONCLUSIONES

Al comparar la alta mortalidad que se presentó en los especímenes de *Anopheles albimanus* Weideman capturados en la región de Córdoba con la casi nula mortalidad de la colonia capturada en Buenaventura y que sirvió de referencia, se llega a la conclusión de que la alta mortalidad es inducida por un agente infeccioso que provoca una enfermedad Epizootica. El tipo de enfermedad producida es infecciosa mixta, debido a que los daños producidos en el tejido se debe a la acción lítica de dos microorganismos.

Dada la necesidad urgente de obtener otros medios de control para *Anopheles albimanus* Weideman uno de los princi-

pales vectores de la malaria en Colombia, es necesario continuar con este trabajo, aislando y purificando estos dos microorganismos para identificarlos y hacer las pruebas de seguridad sanitarias necesarias para determinar si son aptos para ser utilizados en forma amplia como medio de control biológico.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al Licenciado José Arroyave - Microscopista Electrónico (Departamento de Morfología Universidad del Valle) por su asistencia y ayuda en la preparación de las muestras para ser observadas al microscopio electrónico.

BIBLIOGRAFIA

- 1959 Mosquitos of Medical Importance. Agriculture Handbook No. 152 E.U.S. Department of Agriculture U. S. A.
Fork, H. R. y E. Green. 1972. Laboratory Rearing of *Anopheles albimanus* Weideman Mosquito News, 32(4): 509-573.
Gorham, I.R. y Ch. J. Stojanovich 1973 Clave Ilustrada para los mosquitos Anofelinos de Suramérica Occidental Mosquito sistematic. Vol. 5(2) pp.98-156 National communicable Disease Center Atlanta, Georgia Georghiou: G. y C.E. Taylor 1976. Pesticide Resistance as an Evolutionary Phenomenon. Proc. of XV International Congress of Ent. pp. 759-785.

Knutson, LL. 1979 Comunicación Personal.

Sarmiento, G. 1971 El Paludismo en el Valle del Cauca Acta Medica del Valle (1): 41-44.

Actualidades Biológicas, Vol.9, No.31