

UNA RESEÑA DE LOS PATOGENOS Y PARASITOS DE IMPORTANCIA EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE MOSQUITOS

William K. Mora y Robert C. Farr*

INTRODUCCION

A pesar de la fuerte acción de los insecticidas químicos los mosquitos todavía transmiten muchas de las peores enfermedades del hombre. La malaria, una de ellas, está aumentando en algunas partes del mundo por la razón de que los mosquitos transmisores no se presentan susceptibles al 1, 1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil) etano (DDT) y necesitamos insecticidas más potentes. Entonces, es esencial que encontremos otros métodos de control para complementar los insecticidas químicos.

Como consecuencia de lo anterior, se han realizado estudios de varios predadores y parásitos de mosquitos, para ser aplicados en programas de control. De ellos, los parásitos y patógenos son unos de los más prometedores y, por casualidad, los que vamos a describir aquí.

En general, los parásitos y patógenos tienen una ventaja sobre los otros métodos de control por su especificidad y su capacidad de establecerse en el ambiente del mosquito. Pero también, los parásitos y patógenos todavía no son producidos comercialmente por el alto costo de su producción masiva. Esta resulta en parte, por falta de suficiente conocimiento de su biología. Con más conocimiento de ellos, serán un apoyo más, para el control integrado de mosquitos.

NEMATODOS PARASITICOS

(Nematoda: Mermithidae)

Nemátodos mermíthidos han sido reportados en por lo menos 63 especies de mosquitos de todos los continentes, menos en Sur América. Son unos de los candidatos principales como agentes de control biológico, porque producen altos niveles de parasitismo y matan a sus huéspedes. En la actualidad, se han hecho ensayos de campo, mostrando su potencial en el control "antimosquito".

A. Modo de Actuar.

Los tres nemátodos de mayor importancia en el control de mosquitos, especialmente del *Anopheles* son: el *Romanermis culcivorax* (antes el *Reesimermis nielsenii*), el cual infecta a muchas especies de los géneros *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, y otros; el *Diximermis peterseni*, parásito del *Anopheles*; y el *Octomyermis muspratti*, el cual infecta a los géneros *Anopheles*, *Aedes*, y *Culex*. Las tres atacan al estado larvario del mosquito y tienen ciclos de vida parecidos. Nemátodos mermíthidos pasan parte de su ciclo como parásitos y la mayor parte libres en los ecótopos acuáticos. Vamos a describir, en general, el ciclo de *R. Culcivorax*.

La larva del gusano preparásitica ataca al huésped, le perfora la cutícula con el estilete y penetra al cuerpo del mosquito. Después de un tiempo, antes de que se forme la pupa, el nemátodo larvario hace una perforación en la piel y sale, derramándose los fluidos del cuerpo, siempre matando la larva. Los nemátodos postparasíticos, en su habitat, mudan a adultos y se aparean. Cada hembra pone cerca de 2500 huevos que producen formas preparásiticas nuevamente. La larva preparásitica es muy pequeña (1.1 mm de largo); en cambio, la hembra madura mide más o menos 15 mm.

En el laboratorio, el ciclo de vida del *R. culcivorax* dura aproximadamente cuatro semanas. La maduración del huevo dura por lo menos 7 días. La forma preparásitica, aunque puede vivir fuera de la larva-huésped hasta 5 días, únicamente es infecciosa durante los primeros 2 días. El desarrollo en el huésped dura un período de 7 a 10 días. Se puede observar el nemátodo enrollado en tórax en general, pero en el *Anopheles* se encuentra en el abdomen. La forma postparasítica dura de 11 a 13 días.

B. Ensayos y Estado de Desarrollo y Aplicación.

Los nemátodos se prestan a ser reproducidos en masa (Petersen *et al.*, 1978a; Petersen y Willis, 1972) y se pueden

* Biólogos del Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria, Villavicencio, Meta Colombia.

diseminan fácilmente. Estos parásitos son cultivados usando las larvas de mosquitos. Se obtienen machos y hembras adultos que se reproducen en el fondo de arena del ecótopo. Los huevos quedan viables en arena húmeda hasta seis meses y para empollarlos sólo hay que inundar la arena con agua. Los preparásitos emergen en la superficie de la arena donde se pueden recoger por aspiración. Los nemátodos pueden ser aplicados en tres formas: huevos, preparásitos, y postparásitos. Se pueden distribuir en los criaderos usando la técnica que se usa en la aplicación de los insecticidas químicos.

Un nemátodo ha sido aplicado a gran escala en un ensayo de campo para estudiar su capacidad de controlar una población entera de mosquitos. El *R. culcivorax* fue probado en tal experimento contra el *Anopheles albimanus* y el *A. pseudopunctipennis* en El Salvador (Petersen *et al.*, 1978b). El promedio de parasitismo durante las siete semanas de aplicación fue del 58o/o, y se observó que las poblaciones de larvas del *Anopheles* fueron reducidas en el 94o/o al fin de este período.

Estudios usando el *R. culcivorax* y el *D. peterseni* contra varias especies del *Anopheles* en pequeños habitats (<800 m²) mostraron un alto nivel de parasitismo. También se observó en estos experimentos que, muchas veces, los nemátodos se establecieron y permanecieron en los ecótopos después de haberse aplicados.

El *D. peterseni* fue introducido en un estanque natural y, durante el segundo año después de la aplicación, el promedio de parasitismo en el *Anopheles quadrimaculatus* fue del 88o/o (Petersen y Willis, 1974). En otro experimento (Woodward, 1978), el *D. peterseni* fue aplicado varias veces a un estanque, el cual tenía el *A. quadrimaculatus* y el *A. crucians*. Durante los ocho meses después de la última aplicación, el nivel de parasitismo fue del 44o/o. En uno de los más interesantes ensayos con el *R. nielsenii* (*culcivorax*), Petersen y Willis (1975) lo aplicaron en ecótopos naturales, los cuales tenían el *A. crucians*. De los 23 criaderos inoculados, los nemátodos se establecieron en 13, entre ellos, unos temporales.

C. Ventajas.

Los nemátodos tienen muchas ventajas en su uso para el control de mosquitos. Son buenos agentes infecciosos. La forma preparásita busca activamente al huésped. Infecciones naturales e inducidas en poblaciones de *Anopheles spp.* han alcanzado el 100o/o. Ensayos de campo muestran que se puede obtener un nivel alto de parasitismo con una dosis moderada y factible. Estos agentes tienen un efecto "residual"; después de una aplicación frecuentemente se establecen y proliferan en los ecótopos. Por eso, se pueden aplicar por "inoculación" (para establecer el parásito en el ambiente) o por "inundación" (para producir un efecto inmediato). Los nemátodos parecen ser ecológicamente sanos. Pruebas de infección de unos invertebrados y vertebrados acuáticos con el *R. nielsenii* (*culcivorax*) (Ignoffo *et al.*, 1973)

mostraron que estos organismos no son susceptibles al nemátodo.

D. Limitaciones.

El nemátodo es específico para algunos ecótopos. No puede subsistir en agua demasiado alcalina o ácida, ni en agua salada o contaminada. La temperatura también es importante. Por ejemplo, los huevos del *R. culcivorax* no se desarrollan a temperaturas inferiores de 15°C. La susceptibilidad de las larvas a los nemátodos varía por la especie de mosquito.

BACTERIAS PATOGENAS

Las bacterias que forman esporas del género *Bacillus* muestran buen potencial en el control biológico de mosquitos. Representantes de tres grupos en éste género han sido aislados y se están estudiando intensivamente. Algunas especies son muy patogénicas para las larvas de mosquitos. Se prestan a ser reproducidas en masa y posiblemente incorporadas a los habitats acuáticos.

A. Modo de Actuar.

1. El *Bacillus thuringiensis*.

El *B. thuringiensis* es fácilmente distinguido de los otros bacilos patogénicos porque tiene cuerpos parasporales, o cristales de proteína, que se forman durante la esporulación. Esta bacteria se ha usado mucho en la dasonomía para el control de las plagas. Se han aislado unas cepas, las cuales son efectivas contra los mosquitos. El *B. thuringiensis* produce una variedad de exotoxinas (ejs. α —exotoxina y β —exotoxina), pero la que tiene efecto en el mosquito es la σ —endotoxina, parte del cristal parasporal.

Cuando la larva del mosquito ingiere los cristales y esporas de una cepa virulenta, la alcalinidad del intestino y las enzimas presentes, disuelven el cristal soltando la toxina que paraliza el intestino. El pH cambia de alcalino a neutro o ácido, y las esporas pueden germinar. La pared del intestino se daña por los efectos de la toxina y las células del *B. thuringiensis* pueden entrar a la cavidad corporal del insecto. Preparaciones de la σ —endotoxina sola, sin las esporas ni células del *B. thuringiensis*, son suficientes para matar al huésped; pero cuando la bacteria está presente, forma esporas otra vez y éstas se quedan en el ambiente del mosquito.

La BA- ϕ 68, una cepa del *B. thuringiensis* que forma dos cristales parasporales, fue aislada de una larva muerta del *Culex*. En pruebas biológicas se mostró ser más activa contra el *Aedes* que contra el *Culex*. La BA- ϕ 68 puede matar a los

mosquitos en las 24 horas. En el laboratorio usando otras cepas del *B. thuringiensis*, también se han logrado infecciones. Una cepa recién aislado, la variedad *israelensis*, muestra una alta patogenicidad. Con ésta, los *Anopheles spp.* requieren una dosis más alta que los *Culex* o *Aedes* (D. W. Anthony, comunicación personal).

2. *El Bacillus sphaericus.*

El *B. sphaericus* es el agente de control biológico más prometedor de las bacterias. Su actividad como insecticida biológico, aparece cuando el bacilo empieza a formar esporas en su ciclo; ésto se debe a una toxina asociada con la célula entera de la bacteria. Aparentemente la toxina es liberada cuando la larva digiere la bacteria en el intestino, y la toxina penetra la membrana peritrófica, envenenando a la larva. La toxicidad se manifiesta dos días después de que la larva ingiere a los patógenos, pero muchas veces, se muere en el término de 12 horas.

Kellen (1965) reportó una infección del *B. sphaericus* (cepa "K") en las larvas del *Culiseta incidens*. Desde entonces, muchas cepas han sido aisladas con varios grados de patogenicidad para los mosquitos. Una cepa, la SS11-1, es 10,000 veces más virulenta que la cepa "K". El *B. sphaericus* es más eficaz contra el *Culex* que contra el *Anopheles* o el *Aedes*.

3. El Grupo *Bacillus alvei-brevis-circulans.*

Investigaciones preliminares muestran que el modo de actuar es por medio de una toxina soluble, producida por la bacteria durante la esporulación. Este factor es secretado en el medio del bacilo y se sabe que el calor lo inactiva. Pruebas biológicas indican que la toxicidad máxima ocurre entre los cinco y siete días y que las larvas se pueden morir en el término de dos días.

En el laboratorio, más de 100 cepas de este grupo han sido aisladas, las cuales tienen varios grados de actividad.

B. Ensayos — Estado de Desarrollo y Aplicación.

Para aplicar las bacterias patógenas, tienen que ser producidas en masa. El *B. thuringiensis* ya ha sido producido en masa con éxito y con los otros se puede hacer también, usando los métodos de la industria fermentativa. Los bacilos pueden ser aplicados en suspensiones con agua, emulsiones con agua y aceite, y en polvo. Es fácil aplicar las bacterias utilizando los equipos de aspersión.

Ramoska *et al.* (1978) han demostrado la factibilidad de usar estos patógenos en el control de mosquitos. En un ensayo de campo con *Bacillus sphaericus*, tres cepas fueron aplicadas a las larvas del *Culex* y *Psorophora*. Las poblaciones de estas larvas fueron reducidas en un 90%.

C. Ventajas.

Ya existe la técnica para la producción industrial de estos agentes. Son letales en alto grado a ciertas larvas de mosquitos. Por ejemplo, el *Bacillus sphaericus*/SS11-1, en una prueba biológica, mató al 50% de las larvas del *Culex pipiens quinquefasciatus (fatigans)* con una concentración de 100 células/ml. (Singer, 1974). Debido a que estas bacterias son saprófitas y producen esporas resistentes a la desecación y al calor, pueden sobrevivir fuera del huésped. También, Hertlein *et al.* (1979) mostraron la posibilidad que se establecieran en el ecótopo acuático.

D. Limitaciones.

Hay que hacer muchos más ensayos de campo antes de que se puedan aplicar estos agentes de control biológico. Los factores que afectan la variación en la susceptibilidad de las especies de mosquitos a los bacilos, y el modo de actuar de las toxinas, tienen que ser estudiados. La encuesta de estas bacterias debe ser intensificada para aislar cepas más activas contra el *Anopheles*. Parece que estos bacilos no son tóxicos a otros organismos pero hay que hacer estudios más definitivos.

PROTOZOOS PARASITICOS (Microsporida)

Los microsporidios son protozoos microscópicos y parásitos muy comunes de los mosquitos. Hay tres géneros del orden Microsporida de mayor importancia, de los cuales el *Nosema* es transmitido por la ingestión de las esporas, y el *Amblyospora* y el *Paratelothonia* de que únicamente se conoce su transmisión transovarial, o sea, son transmitidos por la hembra por medio de los huevos infectados.

A. Modo de Actuar.

1. El *Nosema.*

Una hembra del *Anopheles*, *Aedes*, o *Culex* infectada por el *Nosema*, pone huevos cubiertos con esporas y el comportamiento natural de una larva recién nacida es comer la cáscara del huevo. Cuando la larva come la cáscara, es muy probable que ingiera algunas esporas del *Nosema*. Después de su ingestión, el microsporidio invade muchos tejidos de la larva.

Una alta infección, en la larva del primero o segundo estado, lleva a cabo su ciclo de vida en la larva, produciendo esporas iguales a las que se encuentran encima de las cáscaras de los huevos. Usualmente la larva muere antes, durante, o después de la transformación a la pupa.

Una baja infección del *Nosema* en la larva deja que la larva pase al adulto donde cumple su ciclo de vida. La longevidad de estos adultos y las posturas de las hembras, con respecto al número de huevos, son la mitad de lo normal. Además, las hembras infectadas no son capaces de producir tantos esporozoitos de la malaria, aún más, reduciendo su capacidad como vectores.

2. El *Amblyospora* y el *Parathelohania*.

En general, el *Amblyospora* y el *Parathelohania* son parecidos en su modo de actuar como patógenos aunque afectan diferentes géneros de mosquitos. El *Amblyospora* afecta a los mosquitos del *Culex*, *Aedes*, *Aedeomyia*, *Mansonia*, y *Culiseta* mientras que el *Parathelohania* afecta a los *Anopheles* y *Aedeomyia*. Hasta ahora, únicamente se conoce su modo de transmisión transovarial. Hay dos ciclos de vida, uno que desarrolla a esporas en la larva, sea hembra o macho, y otro que está latente en la larva y que se cumple en la hembra adulto.

En el primer ciclo de vida se encuentra la infección en unas células de la sangre, los oenocitos, y en el cuerpo graso. Allí estos microsporidios producen esporas y en el proceso generalmente matan a la larva. Estas esporas no son infecciosas y, por eso, puede que vayan a un huésped intermedio antes de que infecten a otra larva.

En el otro ciclo de vida, se encuentra la infección en varios tejidos de la hembra adulto. Esta infección aumenta en los ovarios después de la primera comida de sangre y pasa a los huevos.

B. Ensayos y Estado de Desarrollo y Aplicación.

De todos los géneros de Microsporida que han sido evaluados como agentes de control biológico, el *Nosema* presenta la mejor posibilidad para su uso en el futuro. Se puede guardar sus esporas hasta un año y cuando quiera, aplicarlas suspendidas en agua usando la misma técnica de los insecticidas químicos. La producción masiva de esporas infecciosas, así como su factibilidad económica, están llegando a niveles competitivos con los insecticidas químicos (Anónimo, 1978). Recientemente, unos ensayos de campo se han practicado en Panamá (Anthony *et al.*, 1978) y en Paquistán (Anónimo, 1978). En estos ensayos usando

el *Nosema algerae*, se obtuvo una tasa de infección del 86o/o contra el *Anopheles albimanus* en Panamá y el 50o/o contra el *A. stephensi* en Paquistán. En otra prueba de campo con el *A. albimanus* y el *Nosema stegomyiae (algerae)* se logró una tasa de infección del 70 al 80o/o (Anónimo, 1973).

Con los géneros de la familia Thelohaniidae (i. e. *Parathelohania* y *Amblyospora*) todavía no se han obtenido infecciones en pruebas de campo. La mayor parte de este problema es que no comprendemos en total sus ciclos de vida.

C. Ventajas.

En general, las especies de microsporidios son muy específicas. Parece que el *Nosema* no infecta a otros organismos de los habitats acuáticos. En pruebas biológicas preliminares, únicamente se han encontrado infecciones del *N. algerae* en el *Noctonecta undulata* (Hemiptera), después de una dieta exclusiva de larvas infectadas. Una infección del *Nosema*, si no mata a la larva, reduce la longevidad del adulto y su capacidad como vector. El *Nosema* puede establecerse y permanecer en el ambiente del mosquito, y tiene una alta probabilidad de ser dispersado.

D. Limitaciones.

Unas limitaciones son el alto costo de la producción masiva de las esporas y la falta de un conocimiento total de sus efectos a otros organismos.

HONGOS PARASITICOS

Los hongos tienen un papel importante y viejo en el control biológico. Por ejemplo en Rusia, en el año 1880, usaron el *Metarrhizium anisopliae* para controlar unos cucarrones que se encontraban en el suelo. Pero el papel de los hongos en el control de los mosquitos se encuentra en vía de desarrollo. Por ahora, los de mayor importancia son el *Lagenidium giganteum*, el *Metarrhizium anisopliae*, y varias especies del *Coelomomyces*. Estos producen sus efectos en formas diferentes.

A. Modo de Actuar.

1. El *Lagenidium giganteum*.

El *L. giganteum* es uno de los hongos más prometedores en el control del *Aedes* y *Culex*, y tiene un efecto variable contra el *Anopheles*.

Parece que el *L. giganteum* actúa por medio de privar la larva de sus metabolitos, siempre matándola en el cuarto estado. Su ciclo de vida en la larva empieza cuando unos zoosporas del *L. giganteum* penetran la cutícula de la cabeza o la cavidad bucal. El micelio se desarrolla en la he-

molinfa produciendo esporas o esporangias. Si hay esporangias presentes, tubos de aquellos penetran la cutícula saliendo al agua. Las zoosporas que están desarrollándose en las esporangias pasan al extremo de los tubos donde emergen e infectan a otra larva.

2. El *Metarrhizium anisopliae*.

En la naturaleza, el *M. anisopliae* es patógeno en más de 200 especies de insectos y, aunque no se encuentra naturalmente en los mosquitos, existen cepas efectivas contra los *Aedes*, *Anopheles*, y *Culex*.

Este hongo tiene su efecto obstruyendo el paso de aire en los dos troncos traqueales. En las larvas de mosquitos, todo el aire entra por medio de dos espiráculos. Estas espiráculos están cubiertas con válvulas que están reguladas por músculos. Las esporas del *M. anisopliae* adhieren a estas válvulas, germinan, penetran, y atraviesan la cutícula hasta la cavidad corporal de la larva. El hongo obstruye las espiráculos y por falta de aire, y posiblemente por la producción de algunas toxinas del hongo en la hemolinfa, la larva muere.

3. El *Coelomomyces*.

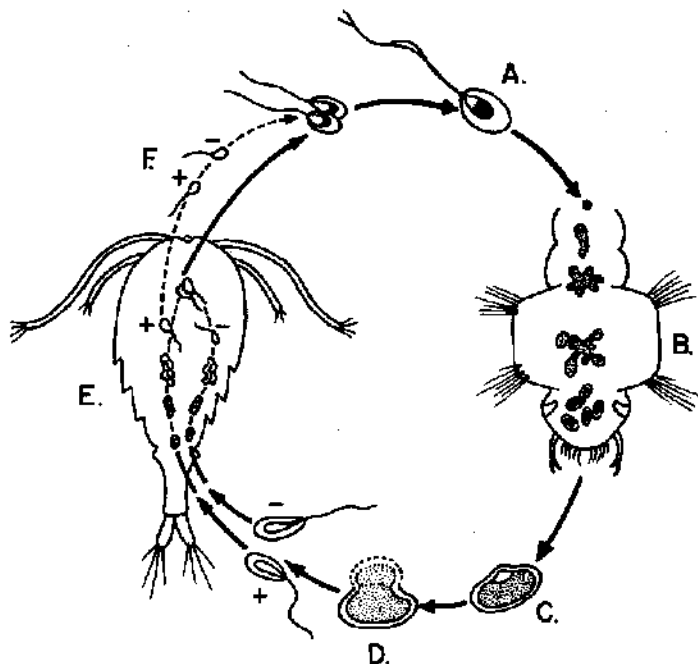
En la naturaleza se encuentra el *Coelomomyces* en los géneros *Aedes*, *Anopheles*, y *Culex*, y

más del 90% de una población de mosquitos puede ser destruida por una infección.

El *Coelomomyces* mata a la larva al destruir el cuerpo graso y otros tejidos esenciales en el desarrollo del adulto. Unas pocas larvas mudan a pupas y, a pesar de la infección, producen adultos infectados que diseminan el hongo a otros ecótopos.

El ciclo de vida del *Coelomomyces* incluye dos huéspedes: la larva de un mosquito y un crustáceo (una copepoda o una ostricoda). El ciclo (ver Figura 1) inicia cuando uno o más zigotos (A) penetran la cutícula de la larva donde se desarrollan los cuerpos hifales. Con el desarrollo de las membranas de los cuerpos hifales, se forman esporangias resistentes (B). Cuando la larva se muere o es destruida por predadores, las esporangias resistentes son soltadas al agua (C). Estas esporangias resistentes pueden ser diseminadas a otros criaderos en el polvo de criaderos secados. Anfibios también pueden llevarlas de criadero a criadero en sus pieles. Bajo buenas condiciones, estas esporangias resistentes sueltan zoosporas de dos sexos (D) que infectan al otro huésped, el crustáceo. Cada zoospora se desarrolla hasta un tallo y eventualmente, gametangia (E). Los gametocitos de sexos opuestos se unen dentro o fuera del crustáceo (F), formando otro zigoto que pueda infectar a otra larva de mosquito. El tiempo mínimo para completar el ciclo es aproximadamente 20 días: 9 días del zigoto a las esporangias resistentes; 4 días para la maduración de las esporangias resistentes; y 7 días de la zoospora al gametocito en el crustáceo.

Figura 1.
El ciclo de vida del *Coelomomyces psarophorae*. (Adaptado de Whisler et al., 1975).



B. Ensayos y Estado de Desarrollo y Aplicación.

En ensayos de campo con el *Coelomomyces* se diseminan las esporangias, las cuales son resistentes a la desecación, al calor, y al frío. Couch (1972) desarrolló un método para la producción masiva del *Coelomomyces* pero es muy complicado y costoso. Están tratando de producirlo *in vitro*, como han hecho con el *M. anisopliae* y el *L. giganteum*, para producir mayores cantidades a precios competitivos.

Se pueden aplicar todos estos hongos en suspensiones con agua, o con aceite (como en el caso de *M. anisopliae*), utilizando los equipos de aspersión.

En 1972, Couch usó el *Coelomomyces* en varios ensayos de campo y obtuvo un promedio de infección del 60% en las poblaciones de larvas. Laird (1967) reportó que el *Coelomomyces* se había establecido en criaderos cinco años después de su inoculación y que el patógeno fue dispersado del sitio original. Estos estudios indican que se puede aplicar el *Coelomomyces* para obtener un mayor grado de control y que este agente puede establecerse y permanecer en el criadero.

Todavía no se han hecho muchos ensayos de campo con el *L. giganteum* ni el *M. anisopliae*, pero lo poco que se ha hecho muestra buenos resultados. Umphlett *et al.* (1972) aislaron unas nuevas cepas del *L. giganteum* y ellos, y McCray *et al.* (1973), mostraron sus capacidades como patógenos de mosquitos. Roberts (1975) demostró que la cepa F84-1-1 del *M. anisopliae* es muy patógena contra el *Anopheles gambiae* en unos ensayos en la Africa.

C. Ventajas.

Una ventaja de estos hongos es que parecen ser muy específicos, afectando únicamente a los insectos. Por ejemplo, en pruebas biológicas, el *M. anisopliae*/F84-1-1 fue ensayado contra unos pescados, artrópodos pequeños, y pláctones de los ecótopos acuáticos y no se observaron infecciones ni efectos toxicológicos. (Roberts, 1975). El *L. giganteum* fue ensayado contra unos mamíferos, pájaros, y peces sin infección, pero no han buscado infecciones en los principales invertebrados que se encuentran en los criaderos. Del género *Coelomomyces* todas las especies son restringidas al orden Diptera fuera de sus huéspedes intermedios.

El *L. giganteum* y las especies del *Coelomomyces* pueden establecerse en los criaderos. También se pueden usar efectivamente algunas especies del *Coelomomyces* y el *M. anisopliae* en aguas sucias y contaminadas, pero el *L. giganteum* requiere aguas limpias para tener mayor patogenicidad.

D. Limitaciones.

Las limitaciones de los hongos son iguales a las de los otros agentes patógenos. Primero, no se conoce bien a todos los otros organismos que posiblemente pueden ser afectados por los hongos. Segundo, todavía nos falta una técnica económica para la producción masiva de las esporangias.

LA IDENTIFICACION DE LOS PATOGENOS DE MOSQUITOS

Las larvas recolectadas de los criaderos deben ser estudiadas vivas.

A. Observación de las Larvas en Cubetas Negras.

El contraste del fondo negro con la larva permite la identificación de unas infecciones. Por ejemplo, muchas veces en infecciones por los microsporidios, se ven manchas blancas en el tórax y el abdomen. Infecciones patentes del hongo *Coelomomyces* se notan fácilmente por el color de la larva: carmelita-naranja a rojo. Comportamiento extraño o colores raros son posibles indicativos de una enfermedad. Larvas enfermas, moribundas, o muertas tienen que ser investigadas.

B. Revisión de las Larvas con Estereoscopio.

Se debe examinar la larva entera, a un aumento de aproximadamente 80X, y anotar la patología y los signos de la enfermedad.

C. Clave General Para la Identificación Preliminar de Ciertos Patógenos.

1. No hay gusanos presentes..... 2

Gusano(s) presente(s), extremadamente largos y delgaditos. Pueden ser blancos o amarillosos. Se encuentran enrollados en el abdomen y a veces en el tórax... NEMATODOS MERMITHIDOS

2. El interior es blanco, o contiene manchas lacteas o grisasas.... BACTERIA O MICROSPORIDA

El interior no es lácteo pero contiene cuerpos hifales y/o esporangias redondas-ovaladas... HONGOS

D. Centro de Referencia de la OMS

Para coordinar la investigación y la identificación de agentes patógenos de los invertebrados de importancia en salud pública, y para facilitar el desarrollo de nuevos métodos en el control de vectores, la Organización Mundial de Salud (OMS) estableció un centro de referencia para el diagnóstico de vectores enfermos. Larvas de mosquitos infectadas con patógenos o parásitos deben ser mandadas a:

Dr. John Briggs, OMS, Centro Internacional de Referencia para el Diagnóstico de Vectores Enfermos, Ohio State University, 1735 Neil Avenue, Columbus, Ohio 43210 EE.UU.

Dr. Briggs tiene estuches para la recolección y despacho de patógenos y parásitos de vectores. Estos se pueden obtener gratis.

APENDICE

A. *La Susceptibilidad de Vectores a los Patógenos y Parasitos.*

Para evitar la ilusión de que los patógenos en el control biológico son superpotentes, vamos a mencionar el tema de la susceptibilidad de los vectores a ellos.

Preferimos usar el concepto de que un vector no es susceptible a que un vector sea resistente o haya desarrollado una resistencia a un agente. Esto es porque la resistencia no incluye la posibilidad de que pueda haber cambios en el comportamiento del vector.

Todos los vectores pueden evolucionar a un punto donde no son susceptibles a un insecticida, sea químico o biológico. Esto puede resultar por el desarrollo de una resistencia física o fisiológica al agente, o de igual importancia, por un cambio de comportamiento donde el vector no se presenta al agente de control.

Por ejemplo, Petersen (1978) observó un descenso en la susceptibilidad del *Culex pipiens quinquefasciatus* al *Romanermis culicivora* después de haber estado expuesto a 300 generaciones en el laboratorio. No podían explicar el cambio en la susceptibilidad. En 1977, Woodward y Fukuda informaron que tenían una cepa "resistente" del *Anopheles quadrimaculatus*, cuya larva era mucho más activa que la de la cepa "susceptible", y que ésta trataba de quitar los preparásitos del *Diximermis peterseni*.

B. *Métodos en la Identificación de los Patógenos.*

1. *Microsporida y las Bacterias.*

Con sospechosas infecciones de Microsporida o de bacterias se hace un aplastamiento (squash) con agua coloreada con una gotica de tinta china. Con el microscopio, al aumento de 300-400X, se confirman las infecciones de microsporidios. Si tiene un microscopio fase-contraste se hacen los aplastamientos con agua; además de Microsporida, se pue-

den confirmar infecciones de varias formas de bacterias, incluyendo endosporas y cuerpos intracelulares (ej. cristales parasporales del *Bacillus thuringiensis*). Para tener un registro permanente de una infección bacterial o de Microsporida se hace un frotis con otra parte de la larva infectada y se colorea con Giemsa.

Para identificar mejor el agente-microsporidio se recomienda usar la coloración hematoxilina y, para el estudio con el microscopio electrónico, hacer la preparación "glutaraldehida-tetroxida de osmio".

En la identificación de una bacteria patógena, en vez de colorear el frotis original con Giemsa, también se puede hacer la coloración de "Gram". Luego se debe aislar el agente bacterial, averiguar su patogenicidad, y caracterizarlo.

La descripción de los métodos (fijación, coloración) ya mencionados se encuentra en Briggs y Weiser (1971).

2. *Nemátodos.*

Sólo los adultos pueden ser clasificados. Entonces en estas infecciones es aconsejable dejar el gusano salir naturalmente del mosquito y después, dejarlo desarrollar en un vaso con agua (el fondo preferible de arena) por aproximadamente dos semanas. El nemátodo adulto se conserva en formalina (3-5o/o) amortiguada. Luego se debe enviar al Dr. John Briggs, quien lo manda a un especialista para su identificación. La taxonomía de los nemátodos mermíthidos a lo mejor es difícil. Se encuentra introducciones en la identificación de los nemátodos en dos artículos por Nickle (1972 y 1973).

3. *Coelomomyces.*

Se puede colorear y montar larvas infectadas (Briggs y Weiser, 1971). También es importante mandar larvas, preservadas en formalina (4o/o) amortiguada, desecadas, o húmedas, al Dr. Briggs. La taxonomía se basa en la morfología y tamaño de la esporangia. Anthony *et al.* (1971) mostraron la utilidad del microscopio electrónico en la diferenciación de unas especies del *Coelomomyces*.

BIBLIOGRAFIA

De los trabajos que siguen no hemos mencionado todos en nuestra elaboración sobre patógenos y parásitos, pero son escogidos por su importancia con respecto al tema.

A. *Bibliografía General de Patógenos y Parásitos.*

- Burges, H. D. y N. W. Hussey 1971. *Microbial Control of Insects and Mites*, Academic Press Inc. London.
- Chapman, H. C. 1974. Biological Control of Mosquito Larvae. *Ann. Revv.Ent.* 19:33-59.
- Chapman, H. C., T. B. Clark, y J.J. Petersen 1970. Protozoans, Nematodes, and Viruses of Anophelines. *Misc. Public. Ent. Soc. Am.* 7:134-139.
- Roberts, D. W. 1970. *Coelomomyces, Entomophthora, Beauveria, and Metarrhizium* as Parasites of Mosquitoes. *Misc. Public. Ent. Soc. Am.* 7: 140-155.

B. *Bibliografía de Nemátodos.*

- Ignoffo, C. M. et al. 1973. Susceptibility of Aquatic Vertebrates and Invertebrates to the Infective Stage of the Mosquito Nematode *Reesimermis nielsenii*. *Mosq. News* 33:599-602.
- Petersen, J. J. 1977. Biology of *Octomyomermis muspratti*, a Parasite of Mosquitoes as it Relates to its Mass Production. *J. Invert. Pathol.* 30:155-159.
- Petersen, J. J. 1973. Role of Mermithid Nematodes In Biological Control of Mosquitoes. *Exp. Parasitol.* 33(2):239-247.
- Petersen, J. J., H.C. Chapman, O.R. Willis, y T. Fukuda 1979b. Release of *Romanomermis culicivorax* for the Control of *Anopheles albimanus* in El Savador II. Application of the Nematode. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27:1268-1273.
- Petersen, J. J., H.C. Chapman, y D.B. Woodard 1968. The Bionomics of a Mermithid Nematode of Larval Mosquitoes in Southwestern Louisiana. *Mosq. News* 28(3):346-352.
- Petersen, J. J., y O.R. Willis 1975. Establishment and Recycling of a Mermithid Nematode for the Control of Mosquito Larvae. *Mosq. News* 35(4):526-532.
- Petersen, J. J. y O.R. Willis 1974. *Diximermis peterseni*: A Potential Biocontrol Agent of *Anopheles* Mosquito Larvae. *J. Invert. Pathol.* 24:20-23.
- Petersen, J. J. y O.R. Willis 1972. Procedures for the Mass Rearing of a Mermithid Parasite of Mosquitoes. *Mosq. News* 32(2): 226-230.
- Petersen, J.J. y O.R. Willis 1970. Some Factors Affecting Parasitism by Mermithid Nematodes in Southern House Mosquito Larvae. *J.Econ. Ent.* 63:175-178.
- Petersen, J.J., O.R. Willis, y H.C. Chapman 1978a. Release of *Romanomermis culicivorax* for the Control of *Anopheles albimanus* in El Savador I. Mass Production of the Nematode. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27:1265-1267.
- Woodward, D.B. 1978. Establishment of the Nematode *Diximermis peterseni* in the Field in Southwest Louisiana Using Laboratory-Reared Material. *Mosq. News* 38(1):80-86.
- Woodward, D.B. y T. Fukuda 1977. Laboratory resistance of the mosquito *Anopheles quadrimaculatus* to the mermithid nematodo *Diximermis peterseni*. *Mosq. News* 37:192-195.

C. *Bibliografía de Bacteria.*

- Davidson, E. W., S. Singer, y J. D. Briggs 1975. Pathogenesis of *Bacillus sphaericus* Strain SSII-1 Infections in *Culex pipiens fatigans* larvae. *J. Invert. Pathol.* 25:179-184.

- Hertlein, B.C., R. Levy, y T. W. Miller 1979. Recycling Potential and Selective Retrieval of *Bacillus sphaericus* From Soil in a Mosquito Habitat. *J. Invert. Pathol.* 33:217-221.
- Kellen, W. R., T. B. Clark, J. E. Lindegren, y B.C. Ho 1965. *Bacillus sphaericus* as a Pathogen of Mosquitoes. *J. Invert. Pathol.* 7:442-448.
- Ramoska, W. A., J. Burgess, y S. Singer 1978. Field Applications of a Bacterial Insecticide. *Mosq. News* 38(1):57-60.
- Reeves, E. L. y C. García 1971a. Pathogenicity of a Bicrystalliferous *Bacillus* Isolate for *Aedes aegypti* and Other Aedine Mosquito Larvae. Proc. IV Intl. Colloq. on Insect Pathol., College Park, Md. Aug. 25-28, 1970. pp. 219-228.
- Reeves, E. L. y C. García 1971b Susceptibility of *Aedes* Mosquito Larvae to Certain Crystalliferous *Bacillus* Pathogens. Proc. 29th. Conf. Calif. Mosq. Cont. Assn., Jan. 25-27, 1971, pp. 118-120.
- Singer, S. 1975. Isolation and Development of Bacterial Pathogens of Vectors, en *Biological Regulation of Vectors*, ed. J.D. Briggs, U.S. Dept. of Health, Education, and Welfare, DHEW Publication No. (NIH) 77-1180. pp. 3-17.
- Singer, S. 1974. Entomogenous Bacilli Against Mosquito Larvae, en *Developments in Industrial Microbiology*, vol. 15, Plenum, N.Y. pp. 187-194.
- Singer, S. 1973. Insecticidal Activity of Recent Bacterial Isolates and Their Toxins Against Mosquito Larvae. *Nature* 244:110-111.

D. Bibliografía de Protozoa.

- Anónimo, 1978. Report of a Meeting on Safety Testing of Microsporidan Parasites of Insect Vectors and Feasibility of Their Use as Biological Control Agents. OMS documento no publicado. WHC/TDR/BCV/78.
- Anónimo, 1973. *Mosquito Control: Some Perspectives for Developing Countries*, National Academy of Sciences, Washington, D.C. pp.28-31.
- Anthony, D. W. M. D. Lotzkar, y S.W. Avery 1978. Facundity and Longevity of *Anopheles albimanus* Exposed at Each Larval Instar to Spores of *Nosema algerae*. *Mosq. News* 38(1)116-121.
- Anthony, D.W., K.E. Savage, E. I. Hazard, S.W. Avery, M.D. Boston, y S.W. Oldacre 1978. Field Tests With *Nosema algerae* Vavra and Undeen (Microsporida, Nosematidae) Against *Anopheles albimanus* Wiedemann in Panama. *Misc. Pub. Ent. Soc. Am.* 11:17-28.
- Anthony, D. W., K. E. Savage, y D.E. Weidhaas 1972. Nosematosis: Its Effect on *Anopheles albimanus* Wiedemann, and a Population Model of its Relation to Malaria Transmission. *Basic Research in Malaria Special Issue, Proc. of the Helminthological Soc. of Washington* 39:428-433.
- Hazard, E. I. y J. Weiser 1968. Spores of *Thelophania* in Adult Female *Anopheles*: Development and Transovarial Transmission, and Redescriptions of *T. legeri* Hesse and *T. obesa* Kudo. *J. Protozoology* 15(4):817-823.
- Savage, K. E., R.E. Lowe, E.I. Hazard y C.S. Lofgren 1971. Studies of the Transmission of *Plasmodium gallinaceum* by *Anopheles quadrimaculatus* Infected with a *Nosema* sp. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 45:845-847.
- Van Essen, F. W. y D.W. Anthony 1976. Susceptibility of Nontarget Organisms to *Nosema algerae* (Microsporida: Nosematidae), A Parasite of Mosquitoes. *J. Invert. Pathol.* 28:77-85.
- Vavra, J. y A.H. Undeen 1970. *Nosema algerae* n.sp. (Chidospora, Microsporida) a Pathogen in a Laboratory Colony of *Anopheles stephensi* Liston (Diptera, Culicidae). *J. Protozoology* 17(2): 240-249.
- Ward, R. A. y K.E. Savage 1972. Effects of Microsporidan Parasites Upon Anopheline Mosquitoes and Malarial Infection. *Basic Research in Malaria, Special Issue, Proc. of the Helminthological Soc. of Washington* 39:434-438.

E. *Bibliografía de Hongos.*

- Couch, J. N. 1972. Mass Production of *Coelomomyces*, a Fungus That Kills Mosquitoes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69(8):2043-2047.
- Federici, B.A. y D.W. Roberts 1976. Experimental Laboratory Infection of Mosquito Larvae With Fungi of the Genus *Coelomomyces*. II. Experiments With *Coelomomyces punctatus* in *Anopheles quadrimaculatus*. *J. Invert. Pathol.* 27:33-341.
- Laird, M. 1967. A Coral Island Experiment: A New Approach to Mosquito Control. *WHO Chron.* 21:18-26.
- McCray, E. M., D. J. Womeldorf, Jr., R. C. Husbands, y D.A. Eliason 1973. Laboratory Observations and Field Tests With *Lagenidium* Against California Mosquitoes. *Proc. and Pap., Ann. Conf. Calif. Mosq. Cont. Ass.* 41:123-128.
- Roberts, D.W. 1975. Isolation and Development of Fungus Pathogens of Vectors, en *Biological Regulation of Vectors, The Saprophytic and Aerobic Bacteria and Fungi, A Conference Report*, U.S. Dept. of Health, Education, and Welfare, Publ. No. (NIH)77-1180, pp. 85-93.
- Roberts, D.W. 1970. *Coelomomyces*, *Entomophthora*, *Beauveria*, and *Metarrhizium* as Parasites of Mosquitoes. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.* 7(1):140-155.
- Umphlett, C.J. 1970. Infection Levels of *Coelomomyces punctatus*, An Aquatic Fungus Parasite, In a Natural Population of the Common Malaria Mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. *J. Invert. Pathol.* 15:299-305.
- Umphlett, C.J. y C.S. Huang 1972. Experimental Infection of Mosquito Larvae by a Species of the Aquatic Fungus *Lagenidium*. *J. Invert. Pathol.* 20:326-331.
- Whisler, H. C., S.L. Zebold, y J.A. Shemanchuk 1975. Life History of *Coelomomyces psorophorae*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72:963-966.

F. *Bibliografía de la Identificación de Patógenos y Parásitos.*

- Anthony, D.W.; H. C. Chapman, y E.I. Hazard 1971. Scanning Electron Microscopy of the Sporangia of Species of *Coelomomyces* (Blastocladales: Coelomomycetacea). *J. Invert. Pathol.* 17:395-403.
- Couch, J. N. y C.J. Umphlett 1963. *Coelomomyces* Infections en *Insect Pathology An Advanced Treatise*, ed. E.I. Steinhaus, Vol. 2 Academic Press Inc. N.Y. pp.149-188.
- Hazard, E.I. y D.W. Anthony 1974. A Redescription of the Genus *Parathelohania* Codreanu 1966 (Microsporida: Protozoa) With a Reexamination of Previously Described Species of *Thelohania* Henneguy 1892 and Descriptions of Two New Species of *Parathelohania* from Anopheline Mosquitoes. U.S. Dept. of Agriculture, Technical Bulletin No. 1505.
- Hazard, E.I. y S.W. Oldacre 1975. Revision of Microsporida (Protozoa) Close to *Thelohania*, With Descriptions of One New Family, Eight New Genera and Thirteen New Species, Agricultural Research Service, U. S. Dept. of Agriculture, Technical Bulletin No. 1530.
- Nickle, W. R. 1973. Identification of Insect Parasitic Nematodes—A Review. *Exp. Parasitol.* 33(2):303-317.
- Nickle, W. R. 1972. A Contribution To Our Knowledge of the Mermithidae (Nematoda). *J. Nematol.* 4(2):113-146.
- Weiser, J. 1968. Guide to the Field Determination of Major Groups of Pathogens and Parasites Affecting Arthropods of Public Health Importance, OMS documento no publicado, WHO/VBC/68.59.
- Weiser, J. y J.D. Briggs 1971. Identification of Pathogens en *Microbial Control of Insects and Mites*, eds. H.D. Burges y N.W. Hussey, Academic Press, London—New York, pp. 13-66.

