



**Universidad de Carabobo**  
**Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología**  
**Departamento de Biología**



**“INFECTIVIDAD DE *Heterorhabditis amazonensis* EN LARVAS DE *Aedes albopictus* (DIPTERA: CULICIDAE) DEL MUNICIPIO NAGUANAGUA, EDO. CARABOBO”**

Autor:

**Br. Marysabel Piña Marrero**

Valencia, Octubre 2014



**Universidad de Carabobo**  
**Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología**  
**Departamento de Biología**



**“INFECTIVIDAD DE *Heterorhabditis amazonensis* EN LARVAS DE *Aedes albopictus* (DIPTERA: CULICIDAE) DEL MUNICIPIO NAGUANAGUA, EDO. CARABOBO”**

Trabajo Especial de Grado presentado ante la Ilustre Universidad de Carabobo, para optar al  
Título de Licenciado en Biología

Tutores:

**Dr. Jonathan Liria**

**Dr. Ernesto San-Blas**

Autor:

**Br. Marysabel Piña Marrero**

## ÍNDICE GENERAL

	Pág
1. Introducción.....	1
1.1 Planteamiento del Problema.....	2
1.2 Justificación.....	4
2. Objetivos.....	5
2.1 Objetivo general.....	5
2.2 Objetivos específicos.....	5
3. Marco Teórico.....	6
3.1 Taxonomía e identificación de <i>Aedes albopictus</i> .....	6
3.2 Biología y ecología de <i>Ae. albopictus</i> .....	7
3.3 Importancia de <i>Ae. albopictus</i> en la salud pública.....	10
3.4 Control de mosquitos.....	12
3.5 Nematodos entomopatógenos.....	13
3.6 Taxonomía y morfología de nematodos entomopatógenos.....	14
3.7 Ciclo biológico de los nematodos entomopatógenos.....	16
3.8 Biología de la asociación nematodo-bacteria.....	18
4. Antecedentes.....	19
5. Materiales y métodos.....	23
5.1 Área de experimentación.....	23
5.2 Recolecta del insecto hospedador ( <i>Ae. albopictus</i> ).....	23
5.3 Reproducción y mantenimiento de <i>Ae. albopictus</i> .....	24
5.4 Nematodos entomopatógenos.....	25

5.5 Reproducción de nematodos.....	25
5.6 Conteo de nematodos.....	26
5.7 Bioensayos de patogenicidad.....	26
5.8 Análisis estadísticos.....	27
6. Resultados.....	28
6.1 Mortalidad de <i>Ae. albopictus</i> para cada grupo evaluado.....	28
6.2 Diferencias entre grupos evaluados.....	34
7. Discusión.....	39
8. Conclusiones.....	44
9. Recomendaciones.....	46
10. Bibliografía.....	49
Anexos.....	58

## Anexos

### Pág

<b>Anexo A.</b> Tabla de resultados arrojados en el test de ANOVA de una vía, para cada uno de los grupos de infección evaluados.....	59
<b>Anexo B.</b> Tabla de resultados arrojados en el test de ANOVA de dos vías, para comparaciones entre grupos de infección evaluados.....	60
<b>Anexo C.</b> Valores promedio (Unidades Probit) de las concentraciones letales de <i>H. amazonensis</i> para el 50 % de las larvas de <i>Ae. albopictus</i> (CL <sub>50</sub> ) calculados para los grupos evaluados en cápsulas. A: 2do estadio; B: 3er estadio.....	61
<b>Anexo D.</b> Valores promedio (Unidades Probit) de las concentraciones letales <i>H. amazonensis</i> para el 50 % de las larvas de <i>Ae. albopictus</i> (CL <sub>50</sub> ) calculados para los grupos evaluados en frascos. A: 2do estadio; B: 3er estadio.....	62
<b>Anexo E.</b> Valores promedio (Unidades Probit) de los tiempos letales para el 50 % de las larvas de 2do estadio de <i>Ae. albopictus</i> (TL <sub>50</sub> ) en cápsulas, a diferentes concentraciones de <i>H. amazonensis</i> A: 600:1; B: 1000:1.....	63
<b>Anexo F.</b> Valores promedio (Unidades Probit) de los tiempos letales para el 50 % de las larvas de 3er estadio de <i>Ae. albopictus</i> (TL <sub>50</sub> ) en cápsulas, a diferentes concentraciones de <i>H. amazonensis</i> A: 100:1; B: 400:1, C: 600:1, D: 1000:1.....	64
<b>Anexo G.</b> Valores promedio (Unidades Probit) de los tiempos letales para el 50 % de las larvas estadio de <i>Ae. albopictus</i> (TL <sub>50</sub> ) en frascos, bajo concentración de 1000 IJs de <i>H. amazonensis</i> , por larva. A: 2do estadio; B: 3er estadio.....	65
<b>Anexo H.</b> Infecciones de <i>Aedes albopictus</i> con <i>Heterorhabditis amazonensis</i> .....	67
<b>Anexo I.</b> Cría de <i>Aedes albopictus</i> .....	68
<b>Anexo J.</b> Cría de nematodos entomopatógenos.....	70

## Índice de Tablas

	<b>Pág</b>
<b>Tabla I.</b> Comparaciones pareadas (prueba de Tukey, $\alpha = 0,05$ ) entre la mortalidad de larvas de 2do estadio de <i>Ae. albopictus</i> causada por diferentes concentraciones de <i>H. amazonensis</i> , a 1 cm de profundidad (cápsulas).....	29
<b>Tabla II.</b> Comparaciones pareadas (prueba de Tukey, $\alpha = 0,05$ ) entre la mortalidad de larvas de 3er estadio de <i>Ae. albopictus</i> causada por diferentes concentraciones de <i>H. amazonensis</i> , a 1 cm de profundidad (cápsulas).....	31
<b>Tabla III.</b> Comparaciones pareadas (prueba de Tukey, $\alpha = 0,05$ ) entre la mortalidad de larvas de 2do estadio de <i>Ae. albopictus</i> causada por diferentes concentraciones de <i>H. amazonensis</i> , a 3 cm de profundidad (frascos).....	32
<b>Tabla IV.</b> Comparaciones pareadas (prueba de Tukey, $\alpha = 0,05$ ) entre la mortalidad de larvas de 3er estadio de <i>Ae. albopictus</i> causada por diferentes concentraciones de <i>H. amazonensis</i> , a 3 cm de profundidad (frascos).....	34

## Índice de Figuras

	Pág
<b>Figura 1.</b> Escutelo de <i>Aedes albopictus</i> , con línea longitudinal media clara.....	6
<b>Figura 2.</b> Vista dorsal de larva de <i>Aedes albopictus</i> (segmentos VIII y X, vista lateral).....	7
<b>Figura 3.</b> <i>Heterorhabditis amazonensis</i> . <b>1:</b> Región anterior (A), región del bulbo basal (B) y región posterior de IJ. Región anterior (D), región posterior con vista ventral (E) y variaciones de tallo y gubernáculo (F, G) del macho. (Barra de escala: A-C = 14 $\mu$ m, D-G = 41 $\mu$ m.). <b>2:</b> Región anterior de la hembra (A). Región vulvar de una hembra anfimíctica con exudados cubriendo la vulva (B). Región vulvar (C) y variación del tallo (D, E) de una hembra hermafrodita. Variación del tallo de una hembra anfimíctica (F, G). (Barra de escala: A-G = 25 $\mu$ m).....	16
<b>Figura 4.</b> Ciclo biológico de nematodos entomopatógenos.....	18
<b>Figura 5.</b> Esquema resumen de grupos de bioensayos realizados (Total= 120 bioensayos).....	27
<b>Figura 6.</b> Mortalidad de larvas de 2do estadio de <i>Ae. albopictus</i> por infección de <i>H. amazonensis</i> a diferentes concentraciones, a 1cm de profundidad (cápsulas).....	29
<b>Figura 7.</b> Mortalidad de larvas de 2do estadio de <i>Ae. albopictus</i> en el tiempo (h), por infección de <i>H. amazonensis</i> a concentraciones de 600 IJs y 1000 IJs por larva, a 1cm de profundidad (cápsulas).....	29
<b>Figura 8.</b> Mortalidad de larvas de 3er estadio de <i>Ae. albopictus</i> por infección de <i>H. amazonensis</i> a diferentes concentraciones, a 1cm de profundidad (cápsulas).....	30

<b>Figura 9.</b> Mortalidad de larvas de 3er estadio de <i>Ae. albopictus</i> en el tiempo (h), por infección de <i>H. amazonensis</i> a diferentes concentraciones, a 1cm de profundidad (cápsulas).....	31
<b>Figura 10.</b> Mortalidad de larvas de 2do estadio de <i>Ae. albopictus</i> por infección de <i>H. amazonensis</i> a diferentes concentraciones, a 3cm de profundidad (frascos).....	32
<b>Figura 11.</b> Mortalidad de larvas de 2do estadio de <i>Ae. albopictus</i> en el tiempo (h), por infección de <i>H. amazonensis</i> bajo concentración de 1000 IJs por larva, a 3cm de profundidad (frascos).....	32
<b>Figura 12.</b> Mortalidad de larvas de 3er estadio de <i>Ae. albopictus</i> por infección de <i>H. amazonensis</i> a diferentes concentraciones, a 3cm de profundidad (frascos).....	33
<b>Figura 13.</b> Mortalidad de larvas de 3er estadio de <i>Ae. albopictus</i> en el tiempo (h), por infección de <i>H. amazonensis</i> bajo concentración de 1000 IJs por larva, a 3cm de profundidad (frascos).....	34
<b>Figura 14.</b> Mortalidad de larvas de 2do y 3er estadio de <i>Ae. albopictus</i> por infección de <i>H. amazonensis</i> a diferentes concentraciones, a 1cm de profundidad (cápsulas).....	35
<b>Figura 15.</b> Mortalidad de larvas de 2do y 3er estadio de <i>Ae. albopictus</i> por infección de <i>H. amazonensis</i> a diferentes concentraciones, a 3cm de profundidad (frascos).....	36
<b>Figura 16.</b> Mortalidad de larvas de 2do estadio de <i>Ae. albopictus</i> por infección de <i>H. amazonensis</i> a diferentes concentraciones, a 1 cm (cápsulas) y 3cm (frascos) de profundidad.....	37
<b>Figura 17.</b> Mortalidad de larvas de 3er estadio de <i>Ae. albopictus</i> por infección de <i>H. amazonensis</i> a diferentes concentraciones, a 1 cm (cápsulas) y 3cm (frascos) de profundidad.....	38

**Infectividad de *Heterorhabditis amazonensis* en larvas de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) del municipio Naguanagua, Edo. Carabobo**

Autor:

Marysabel Piña Marrero

Tutores:

Dr. Jonathan Liria

Dr. Ernesto San Blas

**Resumen**

*Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) es un mosquito del sureste de Asia que posee un importante papel como vector de virus, como el Dengue y Chikungunya. Éste se ha ido dispersando rápidamente a escala mundial, llegando hasta Europa, África y América. Durante décadas se han implementado estrategias de control que consisten primordialmente en el uso de compuestos tóxicos y contaminantes ambientales; es por ello que actualmente, han surgido nuevas alternativas, como el uso de insecticidas de origen biológico, entre los cuales se destacan los nematodos entomopatógenos que se relacionan simbióticamente con bacterias que generan septicemia en el insecto hospedero, causando su muerte. Es por ello que se hace relevante la propuesta de alternativas para el control de *Ae. albopictus*, particularmente aquellas en las cuales se utilicen estos organismos para el control biológico de las larvas. En este estudio se realizaron experimentos para evaluar la infectividad de *Heterorhabditis amazonensis* en larvas de 2do y 3er instar de *Ae. albopictus*, a 1 cm de profundidad (cápsulas) y 3 cm de profundidad (frascos de vidrio) para ello se utilizaron diferentes concentraciones de infectivos juveniles (IJs) 20:1, 100:1, 400:1, 600:1, y 1000:1, junto con el control (0:1). Cada unidad experimental contuvo 20 larvas del mosquito y se realizaron 5 réplicas por bioensayo. El grupo en el cuál se obtuvo mayor mortalidad fue el de larvas de 3er estadio de *Ae. albopictus* en cápsulas, ya que se obtuvo la mortalidad del 50 % de las larvas con 97 IJs por larvas, alcanzado mortalidades de 95 % y 91 % cuando se expusieron a 600 y 1000 IJs por larva, respectivamente. Además, se obtuvo el menor tiempo de mortalidad, registrando la mayor descendencia a las 48 h y con un TL<sub>50</sub> entre 27 h y 36 h para ambas concentraciones. Para el grupo de larvas 2do estadio en cápsulas el porcentaje de mortalidad estuvo entre 70 % para la concentración de 600:1 y 59 % para la concentración de 1000:1, con una DL<sub>50</sub> de 618 IJs por larva; los mayores descensos (45 %) ocurrieron a las 72 h, con TL<sub>50</sub> de 71 h y 78 h, respectivamente. En cuanto a los ensayos a 3 cm de profundidad (frascos) los porcentajes de mortalidad obtenidos estuvieron por debajo del 50 %. Con este estudio se pudo comprobar que es posible la infectividad de nematodos entomopatógenos, principalmente de *H. amazonensis*, en larvas de *Ae. albopictus* en condiciones de laboratorio. Sin embargo, por ser este un estudio preliminar, se deben realizar otras investigaciones en las que se abarquen otros factores determinantes como la efectividad de los nematodos entomopatógenos en condiciones de campo.

Palabras clave: *Heterorhabditis amazonensis*, vector, control biológico, enfermedades sanitarias, mortalidad.

**Infectivity of *Heterorhabditis amazonensis* in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) larvae  
Naguanagua, Carabobo estate**

Author:  
Marysabel Piña Marrero  
Tutors:  
Dr. Jonathan Liria  
Dr. Ernesto San Blas

**Abstract**

*Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) is a Southeast Asia's mosquito that has an important role as vector of viruses, such as Dengue and Chikungunya. This has been spreading rapidly on a global scale, reaching Europe, Africa and America. For decades have been implemented control strategies that consist primarily of the use of toxic compounds and environmental pollutants; that is why they have now emerged new alternatives, such as the use of insecticides of biological origin, foremost among which are the entomopathogenic nematodes that relate symbiotically with bacteria that cause septicemia in the insect host, causing his death. That is why it is important the proposal of alternatives for the control of *Ae. albopictus*, particularly those which use these agencies to the biological control of the larvae. In this study experiments were conducted to evaluate the infectivity of *Heterorhabditis amazonensis* in larvae of 2nd and 3rd instar of *Ae. albopictus*, 1 cm deep (capsules) and 3 cm in depth (glass flasks), to do this was used different concentrations of infective juveniles (IJs) 20:1, 100:1, 400:1, 600:1, and 1000:1, along with the control (0:1). Each experimental unit contained 20 larvae of the mosquito and was made 5 replicas by a bioassay. The group in which it was obtained greater mortality of larvae was the 3rd stage of *Ae. albopictus* in capsules, as it is obtained the mortality rate of 50 per cent of the larvae with 97 IJs by larvae, reached mortalities at 95 % and 91 % when exposed to 600 and 1000 IJs by larva, respectively. In addition, the lowest time of mortality, registering the most offspring at 48 h, and with a  $LT_{50}$  between 27 h and 36 h for both concentrations. For the group of larvae 2nd stage in capsules the percentage of mortality was among 70 per cent for the concentration of 600:1 and 59 per cent for the concentration of 1000:1, with an  $LD_{50}$  of 618 IJs by larva; the greatest decreases (45 %) occurred at 72 h, with  $LT_{50}$  for 71 h and 78 h, respectively. In regard to the testing at 3 cm depth (flasks) the percentages of mortality obtained were below 50 %. With this study, it was possible to prove that it is possible the infectivity of entomopathogenic nematodes, mainly of *H. amazonensis*, in larvae of *Aedes albopictus* in laboratory conditions. However, because this is a preliminary study, must be carried out other research in the covering other determining factors such as effectiveness of entomopathogenic nematodes in field conditions.

**Key Words:** *Heterorhabditis amazonensis*, vector, biological control, health diseases, mortality.

## DEDICATORIA

*A mis padres, por su amor y apoyo incondicional en todo momento, siempre impulsándome a ser mejor persona y respetando cada una de las decisiones que he tomado respecto a mi vida y mi carrera; por ser grandes ejemplos a seguir para mí y para mis hermanos; por enseñarme cuáles son las cosas realmente importantes en la vida, y a luchar por cada meta o sueño que deseo realizar. Son una bendición y soy muy afortunada de tenerlos. Este logro es para ustedes, los quiero muchísimo.*

*A mis hermanos, por ser otros grandes ejemplos a seguir en mi vida; por todas las experiencias compartidas. A María Gabriela, por ser una segunda madre para mí, siempre apoyándome, enseñándome e impulsándome. A Pablo, por su cariño y protección. Son las personas más maravillosas con las cuáles pude crecer y criarme, y a pesar de nuestras diferencias, siempre seremos hermanos y los adoro.*

*A mi sobrino, Félix Antonio, por ser la estrella más hermosa que mis ojos han podido ver nacer y crecer. Iluminó mi vida en momentos difíciles y es la mayor felicidad que la vida me ha dado el privilegio de tener. Te quiero muchísimo.*

## AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. Ernesto San Blas, por su disposición y apoyo para la realización de este trabajo, siempre se mostró atento a colaborar en todo lo que fuese necesario; por todas sus enseñanzas y guía, siempre ayudándome a disipar dudas y aconsejándome sobre lo que podría realizar. Por su entendimiento y comprensión a cada uno de los problemas que se presentaron, no fue sencillo y a pesar que fueron varios, siempre mostró una actitud positiva y comprensiva hacia los mismos. Por su atención, cariño y apoyo durante mi estadía en Maracaibo y durante todo este tiempo. Gracias por aceptar ser mi tutor, y además de ello ser un padre en nematología para mí.*

*Al Dr. Jonathan Liria, por su apoyo y guía en este trabajo, y en todo momento. Desde que le comenté que me gustaba la nematología no dudo en apoyarme, a pesar de que su especialidad es la entomología, siempre estuvo dispuesto a ayudarme para que pudiera continuar y ampliar mis conocimientos en esta área. Gracias a su propuesta pudimos combinar ambos estudios y fue posible la realización de mi tesis. Gracias por su cariño, por haber creído en mí y haberme apoyado desde que era mi profesor de Biología Animal, es un gran ejemplo a seguir y una persona admirable.*

*A Maira Hernández, por enseñarme lo esencial sobre la cría de mosquitos; sus conocimientos y apoyo me permitieron realizar una parte esencial de mi tesis. Por ser una amiga incondicional y ser la persona con la que viví todo este trayecto, desde el inicio hasta la culminación del trabajo. Por todas las anécdotas, risas y lágrimas compartidas.*

*Al Lic. Edgar Portillo, por enseñarme lo esencial de la reproducción y cría de los nematodos entomopatógenos, y siempre estar dispuesto a ayudarme y disipar mis dudas.*

*A las MSc. Dana Garcia, Lic. Patricia Morales y Lic. Deynireth Pirela, por su amistad y compañía mientras realicé mis pasantías en Maracaibo, fue de mucho apoyo conocer y compartir con personas tan especiales como ustedes que estuvieron allí en todo momento.*

*Al Laboratorio de Protección Vegetal del Centro de Estudios Botánicos y Agroforestales del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) conjuntamente con el Instituto Zuliano de Investigaciones Tecnológicas (INZIT), por permitirme hacer uso de sus instalaciones, instrumentos y materiales, para el aprendizaje de la cría de nematodos entomopatógenos.*

*A Jessica, por su amistad incondicional durante estos años de carrera, por ser una gran compañera de clases y de laboratorio, una amiga excepcional y un gran ejemplo a seguir. Además, gracias a ti ya tu familia por abrirme las puertas de su hogar.*

*A Andrea, por ser una hermana para mí. Por sus consejos, su apoyo y su cariño incondicional. Por ser la mejor compañera de residencia y la mejor compañera de cuentos que pude tener.*

*A Oriana, por su amistad y por haberme abierto las puertas de su hogar durante un período esencial de la realización de mi tesis. Por los momentos de risa y peleas que siempre nos unirán.*

*A Denys, Simón, James, Angel y Julio, por su valiosa amistad. Por los buenos momentos que hemos compartido juntos, por su compañía en los malos, por sus locuras y todo lo que me han enseñado en el tiempo que llevo conociéndolos. Son grandiosos amigos y los quiero mucho.*

## 1. INTRODUCCIÓN

*Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) es un mosquito de origen asiático, específicamente del sureste de Asia que, de forma similar a *Aedes aegypti*, posee un importante papel como vector de virus, principalmente de los virus Dengue y Chikungunya. Esta especie se ha ido dispersando rápidamente, llegando hasta Europa, África y América, y aunque está mayormente asociado a áreas rurales y suburbanas, se ha reportado competencia entre ambas especies de *Aedes* en ambientes urbanos, en donde *Ae. albopictus* desplaza a *Ae. aegypti* y aumenta su población (Salvatella, 1996; Valdés *et al.*, 2009; Alarcón *et al.*, 2010; Ramírez *et al.*, 2012; Rúa *et al.*, 2012). Para controlar estas especies se han implementado estrategias que consisten primordialmente en el uso de compuestos tóxicos y contaminantes ambientales; es por ello que actualmente, han surgido nuevas alternativas, como el uso de insecticidas de origen biológico, entre los cuales se destacan bacterias, hongos, virus y nematodos entomopatógenos, que permiten la disminución de estos insectos (Becker & Rettich, 1993; Perveen, 2011).

Por su parte, los nematodos son un Phylum de metazoos de alta diversidad. Se estima la existencia de aproximadamente entre un millón a 10 millones de especies de éstos (Meldal *et al.*, 2007; Abebe *et al.*, 2011), siendo descritas hasta los momentos alrededor de 20000 especies. Son gusanos fusiformes con pseudoceloma, sección circular, simetría bilateral y sin segmentación corporal, su longitud varía entre 0,3 mm y 8 m (Seijas, 2004). Estos organismos poseen un cuerpo revestido de una cutícula no celular relativamente gruesa (hipodermis) secretada por la epidermis subyacente, que les confiere protección en todo tipo de hábitat (Lara *et al.*, 2003). La elevada riqueza del Phylum, en parte está asociada a los hábitats que han colonizado y los recursos que explotan del mismo. Así, se encuentran nematodos asociados a insectos (entomofílicos), abarcando relaciones desde la foresis hasta el parasitismo (García, 1994). Algunas especies parásitas de humanos, otros animales y plantas, utilizan las larvas de insectos

que cumplen el estadio juvenil dentro del ecosistema acuático como hospedadores intermedios, sin causar daño en los mismos (Doods, 2002). Sin embargo, existen nematodos entomoparásitos, facultativos u obligados, que utilizan al insecto como un hospedador intermedio o definitivo, y se alimentan de éste. También se encuentran nematodos entomopatógenos (NEPs) que no se alimentan directamente de los hospedadores, sino que se relacionan simbióticamente con bacterias que generan septicemia en el insecto hospedero, causando su muerte (García, 1994). Debido a lo anteriormente expuesto, el presente estudio pretende evaluar la infectividad del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis amazonensis* en larvas de *Ae. albopictus*.

## 1.1 Planteamiento del problema

*Aedes albopictus* es un mosquito originario del sureste de Asia que se ha ido dispersando rápidamente en el continente de origen y el mundo, llegando hasta Europa en 1979 (Adhami & Reiter, 1998), África en 1991 (Rúa *et al.*, 2012) y América en 1985, teniendo su primer registro en el estado de Texas, Estados Unidos (Sprenger & Wuithiranyagool, 1986); encontrándose posteriormente en República Dominicana, México, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Cuba, Panamá (Rúa *et al.*, 2012; Mesa *et al.*, 2013), Brasil (Forattini, 1986), Bolivia (Rúa *et al.*, 2012), Colombia (Vélez *et al.*, 1998), Argentina (Rossi *et al.*, 1999), Uruguay (Rossi & Martinez, 2003) y, recientemente, en Venezuela. En este último país tuvo su primer registro en 2009 en la ciudad de Caracas (Navarro *et al.*, 2009), luego se registró en el estado Aragua (Ramírez *et al.*, 2012), seguidamente Guárico y Monagas (Quinto *et al.*, 2013) y finalmente, en Carabobo (2014- datos no publicados). *Aedes albopictus* es vector de enfermedades de importancia en salud pública, como el dengue, la fiebre Chikungunya, fiebre amarilla, encefalitis equina, entre otras (Bueno & Jiménez, 2012; Muñoz & Navarro, 2012; Rúa *et al.*, 2012); las cuales han sido responsables de millones de muertes a

nivel mundial (Cerdea *et al.*, 2008). Algunos planes para el control de mosquitos se han basado en el uso de insecticidas químicos como malatión, pirimifos-metil, temefos, deltametrina, permetrina, diflubenzuron, metropeno, fenoxicarb y piroproxifen, que tienen un efecto residual y son altamente tóxicos en algunos casos (Pretty, 2005; Pérez & Molina, 2009; García, 2011). Además, el efecto de éstos sobre las poblaciones de mosquitos no es permanente e induce la generación de resistencia en los mismos, perdiendo efectividad en el tiempo (Scholte *et al.*, 2007). Actualmente la explosión demográfica ha conllevado a la expansión de los urbanismos y al aumento de la producción de desechos sólidos, que favorece la reproducción y establecimiento de los mosquitos (Becker & Rettich, 1993; Eiman *et al.*, 2012). Venezuela presenta una alta densidad de mosquitos debido a sus cálidas temperaturas, su demografía y deficiencia en sus servicios públicos (Barrera *et al.*, 1995). Esto conlleva a la incidencia de enfermedades transmitidas por los mismos; a finales de enero de 2014 se reportaron 9091 casos de dengue en el país, casi duplicando los 4819 casos que se reportaron para el mismo mes en 2013, manteniendo la enfermedad en situación de alerta (MPPS, 2014a). Recientemente, a principios de octubre, se mantiene la situación de alerta por dengue, reportándose un acumulado de 59729 casos (20000 casos más de lo reportado para el mismo período en 2013) (MPPS, 2014c). Además, se han reportado 934 casos de fiebre Chikungunya en el país hasta la segunda semana del mes de octubre (MPPS, 2014d), desde los primeros casos importados reportados en el mes de junio (MPPS, 2014b). La presencia de *Ae. albopictus* puede relacionarse con el incremento del dengue por su resistencia ecológica, la capacidad de transmisión transovárica de los cuatro serotipos del virus, entre otros (Vélez *et al.*, 1998). Es por esto que se hace necesario buscar alternativas de control que sean menos perjudiciales, de mayor extensión, y más eficaces para el manejo de las poblaciones y la disminución de incidencia de enfermedades.

## 1.2 Justificación

Actualmente han surgido estrategias para el manejo integrado de *Ae. albopictus*; las cuales se centran, principalmente, en la implementación de técnicas que no involucren el uso de productos tóxicos. Algunas de éstas se basan en la concientización y participación de la comunidad, con el fin de disminuir el número de criaderos disponibles para los mosquitos; el uso de sustancias que inhiban el desarrollo y reproducción del organismo, la manipulación genética, el uso de bioinsecticidas por medio de un organismo (bacterias, nematodos, otros artrópodos) que depreda, parasite o infecte al culícido (Becker & Rettich, 1993; Poopathi & Tyagi, 2006; García, 2011; Perveen, 2011). Recientemente los NEPs están siendo utilizados en el manejo integrado de insectos plaga que afectan principalmente a los cultivos de importancia agrícola (Hazir *et al.*, 2004; Nicholls, 2008). Éstos tienen la habilidad de penetrar al hospedador, y causar la muerte por septicemia, debido a que están asociados con una bacteria que produce infección en el insecto una vez que el nematodo se ha alojado. La muerte ocurre en un período corto de tiempo y los nematodos se reproducen en el interior del insecto, liberándose una vez que ha ocurrido el agotamiento de los recursos (Gaugler, 2002; Dillman *et al.*, 2012). Estos organismos poseen un amplio rango de hospederos dentro del grupo de los insectos, lo cual facilita su cría; son de fácil reproducción, ya que poseen un ciclo de vida corto y en un hospedador favorable pueden llegar a producirse desde 200000 (Rosales *et al.*, 2009) a 350000 juveniles infectivos de estos (Nguyen & Smart, 1990); son fáciles de manipular, por su tamaño micrométrico; pueden reproducir tanto *in vivo* como *in vitro*; no afectan otros organismos que no sean insectos, lo cual significa que no son perjudiciales para los humanos, otros animales y plantas. Además, se han reportado casos efectivos para insectos acuáticos como algunos culícidos de los géneros *Culex* y *Aedes*, a pesar de su hábito terrestre (Poinar & Kaul, 1982; Molta & Hominick, 1989; Divya & Sankar, 2009; Ulvedal, 2012).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Evaluar la patogenicidad de *Heterorhabditis amazonensis* en larvas de *Aedes albopictus*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar el porcentaje de infección y las diferencias entre las concentraciones utilizadas de *H. amazonensis* en larvas de 2do y 3er instar de *Ae. albopictus* a diferentes profundidades.
- Estimar la concentración de nematodos entomopatógenos y el tiempo en el cual se obtiene el 50 % de mortalidad de las larvas (CL<sub>50</sub> y TL<sub>50</sub>).
- Comparar la mortalidad de larvas de *Ae. albopictus* del 2do y 3er estadio, a diferentes profundidades, ante la infección de *H. amazonensis*.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Taxonomía e identificación de *Aedes albopictus*

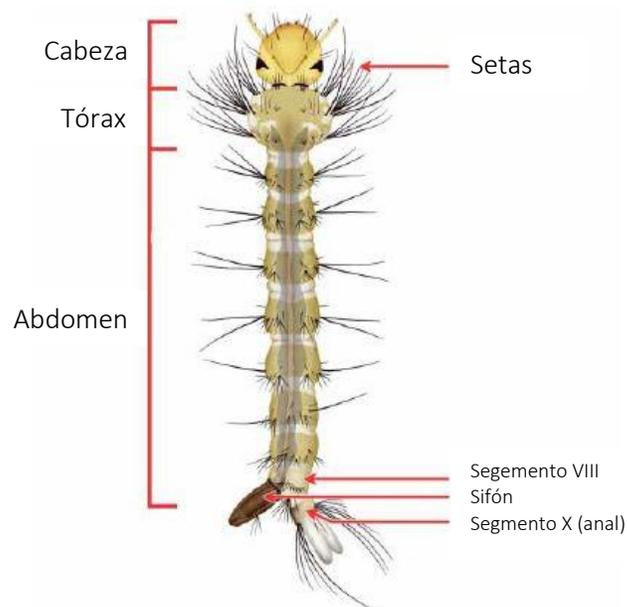
*Aedes albopictus* es un organismo que pertenece a la Clase Insecta, Orden Diptera, Suborden Nematocera, familia Culicidae, subfamilia Culicini, género *Aedes*, subgénero *Stegomyia* (Bandii *et al.*, 2007). Para diferenciar el género *Aedes* de otros culícidos, en hembras adultas, se utilizan las siguientes características: posee setas postespiculares y el abdomen lo tiene dirigido apicalmente. Otras características más generales son la presencia de palpos a 0,3 partes o menos de longitud de la probóscide, escutelo trilobulado, setas preespiculares ausentes. En cuanto a *Ae. albopictus*, ésta se puede reconocer por la presencia de escamas blancas y anillos basales en tarsómeros, poseen escamas claras en el tórax y el abdomen de color blanco-plateado, el escutelo tiene una línea longitudinal media clara (Figura 1) y no posee líneas submedianas ni laterales con escamas claras (Darsie & Samanidou, 1997).



**Figura 1.** Escutelo de *Aedes albopictus*, con línea longitudinal media clara. Tomado de Rueda (2004).

Por su parte, el estadio larval del organismo puede reconocerse mediante el empleo de quetotaxia (tipo y número de setas) en los distintos tagmas (cabeza, tórax y abdomen) (Fig. 2) (Harrison & Rattanarithikul, 1973). En particular, presentan un sifón fusiforme alargado con un

par de setas subventrales, y un cepillo ventral sin mechones fuera del área rayada, con setas cortas simples (sin rafimicaciones). Con suturas maxilares que alcanzan la parte posterior (Gerberg & Arnett, 1976). Cabeza: Setas 1-C no es muy gruesas; seta 4-C cefálica hasta seta 6-C. Abdomen: Setas 1,2-I-VII no estrelladas; sifón con espinas del pecten no fuertemente accionadas; espinas del pecten con dos o más dentículos subapicales. Cepillo ventral (4-X) con 4 pares de setas; seta 4-a,b X única; escala del peine sin espinas subapicales (Rueda, 2004). Tubérculos de grupos pleurales de mesotórax (cerdas 9-12) con espinas muy cortas; dientes del peine con espículas basales pequeñas; cerda 7-C doble (Darsie, 1988). Su longitud promedio va desde el milímetro (en el 1er estadio) hasta alcanzar entre 6 a 7 mm en el 4to estadio (Salvatella, 1996).



**Figura 2.** Vista dorsal de larva de *Aedes albopictus* (segmentos VIII y X, vista lateral). Tomado y modificado de Rueda (2004).

### 3.2 Biología y ecología de *Ae. albopictus*

*Aedes albopictus* presenta hábitos estrechamente ligados a regiones con abundante vegetación, como zonas suburbanas o rurales, debido a su origen selvático-arborícola. Adaptándose de esta manera, a una gran variedad de criaderos naturales como huecos de árboles,

agujeros de cañas de bambú, axilas de plantas, charcas y depósitos de agua en grietas de rocas (Salvatella, 1996; Vélez *et al.*, 1998; Valdés *et al.*, 2009; Alarcón *et al.*, 2010; Ramírez *et al.*, 2012; Rúa *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha encontrado a esta especie cohabitando en zonas urbanas junto con *Ae. aegypti*, desarrollándose en criaderos artificiales como floreros, cauchos, jarrones, macetas, latas, barriles, entre otros (Salvatella, 1996; Valdés *et al.*, 2009; Alarcón *et al.*, 2010; Ramírez *et al.*, 2012; Rúa *et al.*, 2012).

Diversos factores intervienen en la biología, dispersión y establecimiento de *Ae. albopictus*. Dentro de los más importantes se destacan: factores climáticos, desplazamiento de la población, disponibilidad de recipientes artificiales y saneamiento del domicilio (Valdés *et al.*, 2009; Marquetti *et al.*, 2012). Aunado a ello, se encuentran factores intrínsecos como la elevada variabilidad genética de esta especie, junto con su plasticidad fisiológica y ecológica, que le permite adaptación y colonización de diversas áreas (Alarcón *et al.*, 2010; Marquetti *et al.*, 2012; Ramírez *et al.*, 2012), junto con su rango de vuelo (Valdés *et al.*, 2009), el cual se encuentra alrededor de unos 100 m (Vélez *et al.*, 1998). Los factores climáticos con mayor influencia sobre el desarrollo de *Ae. albopictus* son la temperatura y la humedad relativa; ya que desempeñan un papel relevante en su supervivencia (Benedict *et al.*, 2007; Alarcón *et al.*, 2010).

Estudios anteriores han determinado que, en condiciones de laboratorio, las hembras sobreviven un período de aprox. 35 días, aunque a 22 °C y 80 % HR, pueden pasar de los 80 días. También se ha reportado que éstas pueden vivir 1,5 veces más que los machos a una temperatura constante; sin embargo, se estima que el ciclo de vida en la naturaleza es más corto. Se ha comprobado que a 25 °C en campo, el tiempo promedio desde que el adulto emerge, hasta su primera alimentación es de dos días, y de cinco días un ciclo gonotrófico. En cuanto al desarrollo

de los embriones dentro de los huevos, puede variar de dos días a dos semanas; siendo de una semana a 21 °C y 70-80 % de HR. Por su parte, las larvas pueden desarrollarse en seis días a 30 °C, nueve días a 25 °C y trece días a 20 °C (Alarcón *et al.*, 2010). Lo que significa que ambientes cálidos y altamente húmedos son propicios para el desarrollo de este mosquito (Benedict *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha demostrado que puede adaptarse a bajas temperaturas ambientales (Salvatella, 1996; Vélez *et al.*, 1998; Rúa *et al.*, 2012).

Las hembras son hematófagas y se alimentan en dos períodos principales, al amanecer y antes de anochecer, donde la intensidad de luz es baja. Además, poseen capacidad de transmisión de enfermedades vía transovárica. Mientras que los machos se alimentan del néctar de las plantas; pero permanecen cercanos para la reproducción (Vélez *et al.*, 1998; Badii *et al.*, 2007). Los huevos son de color blanco al momento de la ovipostura, y cuando se desarrolla el embrión cambian a color negro, miden menos de un milímetro de largo. Son resistentes a temperatura extrema y desecación, permaneciendo viables durante siete meses a un año (Salvatella, 1996), ya que eclosionan cuando se colocan en agua nuevamente (Sivanathan, 2006). Las larvas pasan por un ciclo de cuatro estadios, poseen movimientos en forma de S y verticales de la superficie al fondo del recipiente donde se encuentren, se alimentan del material orgánico disponible (Salvatella, 1996). Cuando está finalizando el cuarto estadio, la larva cesa la alimentación y permanece en la superficie, hasta que se convierte en pupa y no requieren de alimentación (Sivanathan, 2006).

### 3.3 Importancia de *Ae. albopictus* en la salud pública

*Aedes albopictus*, es vector de enfermedades de importancia médica entre las cuales se encuentran el dengue, la fiebre amarilla, fiebre chikungunya, fiebre del río Ross, fiebre del Nilo Occidental, encefalitis equina, encefalitis japonesa, fiebre mayaro, en algunas de éstas se ha comprobado la transmisión experimental a través del mismo (Bueno & Jiménez, 2012; Muñoz & Navarro, 2012; Rúa *et al.*, 2012).

El dengue es una enfermedad causada por el virus DENV (por sus siglas en inglés), que posee cuatro serotipos conocidos hasta ahora: DENV1, DENV2, DENV3, DENV4. Éstos producen también la fiebre hemorrágica del dengue (Vezzani & Carbajo, 2008; Brant, 2011), la cual es la forma clínica grave. El reservorio final de este virus es el hombre, de allí deriva su importancia médica, siendo las regiones geográficas de mayor recurrencia de esta enfermedad: Asia tropical, África occidental y oriental, Polinesia y Micronesia, América central, el Caribe, gran parte de Sudamérica y Australia (García *et al.*, 2008).

La fiebre amarilla es una enfermedad producida por un virus de la familia Flaviviridae, al igual que el virus del dengue (Vainio & Cutts, 1998). El hombre también es su reservorio final, y está presente tanto en África como en América (García *et al.*, 2008). En su transmisión hay tres patrones epidemiológicos, el del bosque, el urbano, y uno que engloba a los dos; tanto en el primero como en el último el hombre es un hospedador accidental, ya que los principales reservorios son los monos. Cuando un mosquito se alimenta de un organismo infectado, el virus permanece viable en el de 12-21 días, hasta que el mismo mosquito se alimenta de un organismo susceptible. La incubación en el humano dura de tres a seis días y el virus es viable hasta el cuarto día luego de la aparición de los síntomas (Vainio & Cutts, 1998).

La fiebre chikungunya es causada por un virus del mismo nombre (CHIKV) del género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae*, mide aproximadamente 0-70 nm de diámetro y está compuesto de ARN monocatenario. Este virus se relaciona con otros *Alphavirus*, como los virus Mayaro, del Río Ross y de encefalitis equina Venezolana. Los síntomas de la enfermedad aguda suelen aparecer súbitamente después de un periodo de incubación intrínseca de tres a siete días, luego de que un mosquito infectado se ha alimentado de un humano susceptible (Swaroop *et al.*, 2007; OPS, 2011; Porta, 2012).

La encefalitis equina (E. E.) del Este, del Oeste y Venezolana, también es producida por un virus del género *Alphavirus*, familia *Togaviridae* (De la Hoz, 2000). Como su nombre lo indica puede causar encefalitis graves en caballos; sin embargo, los humanos pueden ser hospedadores accidentales. Los reservorios principales, por los cuales se infectan los mosquitos, son las aves. Las tres enfermedades causadas por el virus de E. E. difieren entre sus sintomatologías y períodos de afección. A diferencia de las enfermedades anteriores, los virus de las E.E. del Este y del Oeste no se encuentran en la sangre ni el líquido cefalorraquídeo y los humanos no son reservorios de estos; aunque podría suceder en el caso de la E.E. Venezolana (Vargas *et al.*, 2009; CFSPH, 2010).

La fiebre del mayaro es producida por un alfavirus de la familia *Togaviridae*. Esta enfermedad es menos concurrida que las antes mencionadas, los brotes han sido esporádicos y se localizan principalmente en la región del Amazonas. Al igual que el resto de los virus, es transmitido por el mosquito hembra que lo ingiere cuando se alimenta de un hospedador con altos niveles del virus en la sangre. Éste se multiplica en el intestino, pasa a la hemolinfa hasta las

glándulas salivales, donde se establecen y vuelven a multiplicarse (Azevedo *et al.*, 2009; Coimbra *et al.*, 2007; Muñoz & Navarro, 2012).

### **3.4 Control de mosquitos**

Desde hace décadas, el control básico de insectos de importancia médica se ha basado en el uso de productos químicos (insecticidas), los cuales se han formulado a través del tiempo para mejorar su efectividad. La mayoría de estos productos están compuestos de sustancias que actúan en el sistema del organismo y afectan procesos celulares, tanto bioquímicos como fisiológicos; siendo el sistema nervioso el principal sitio de acción. Comúnmente estos pueden ser inhibidores físicos, protoplasmáticos, inhibidores metabólicos, neurotoxinas y agonistas de hormonas (Perveen, 2011). Sin embargo, aunque estos químicos son efectivos en primera instancia, los insectos se vuelven resistentes a los mismos (Scholte *et al.*, 2007). Además, las sustancias que los componen tienden a acumularse de forma residual, causando grave impacto en el ambiente; incluso, algunos poseen altos niveles de toxicidad y son inespecíficos, por lo que afectan a otros animales, incluyendo humanos. Algunos de estos insecticidas son malatión, pirimifos-metil, temefos, deltametrina, permetrina, diflubenzuron, metopreno, fenoxicarb y piroproxifen (Pretty, 2005; Pérez & Molina, 2009; García, 2011). Debido a estos motivos, actualmente han surgido alternativas que permiten el manejo integrado de plagas, que se basa en el desarrollo y combinación de diversas técnicas y medidas para reducir y mantener las poblaciones de organismos plaga en niveles aceptables, disminuyendo el uso de plaguicidas y por ende, el impacto ecológico del mismo (Perveen, 2011). Entre estas alternativas se encuentran:

*Control cultural:* Está basado principalmente en la concientización de las personas, que son los principales responsables y perjudicados directos de la situación, para que participen en la

reducción y/o eliminación de potenciales criaderos artificiales para los mosquitos. Esto facilita el resto de las tareas del manejo integrado (García, 2011).

*Control no-químico y químico degradable:* En este grupo encontramos básicamente cuatro medidas principales como el uso de agentes tensioactivos, los cuales son químicos no iónicos, biodegradables que forman una capa monomolecular que impide la respiración de las larvas (Poopathi & Tyagi, 2006); las perlas de poliestireno expandido que forman una capa gruesa y seca en la superficie e impiden la respiración de las larvas, la emergencia de los adultos y la ovoposición (Sivagnaname *et al.*, 2005), permite el tratamiento del agua sin contaminar, ni producir daños ambientales. También existen los reguladores de crecimiento de insectos, que son insecticidas de tercera generación, los cuales poseen una mayor especificidad y son más seguros para el resto de los animales (incluyendo humanos). Por último, se encuentra la manipulación genética, que se basa en la liberación de machos estériles, que puedan competir y desplazar a las especies plaga (Poopathi & Tyagi, 2006).

*Control biológico:* Este tipo de control se basa en el uso de organismos vivos (o sus productos derivados) que afecten al organismo plaga. Entre los organismos utilizados se encuentran los enemigos naturales (depredadores, parásitos y parasitoides) y los patógenos de insectos (Lord, 2007). Ubicándose en este último grupo los nematodos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* (Gaugler, 2002).

### **3.5 Nematodos entomopatógenos**

Los nematodos entomopatógenos son un grupo de organismos que afectan específicamente a la Clase Insecta del Phylum Arthropoda. Se encuentran asociados con bacterias que producen

septicemia en el organismo y posteriormente su muerte. Cuando el nematodo penetra al insecto, las bacterias son liberadas en la hemolinfa, luego que éste muere por infección, los nematodos se alimentan del caldo nutritivo que componen las bacterias y los tejidos digeridos por éstas (Dillman *et al*, 2012).

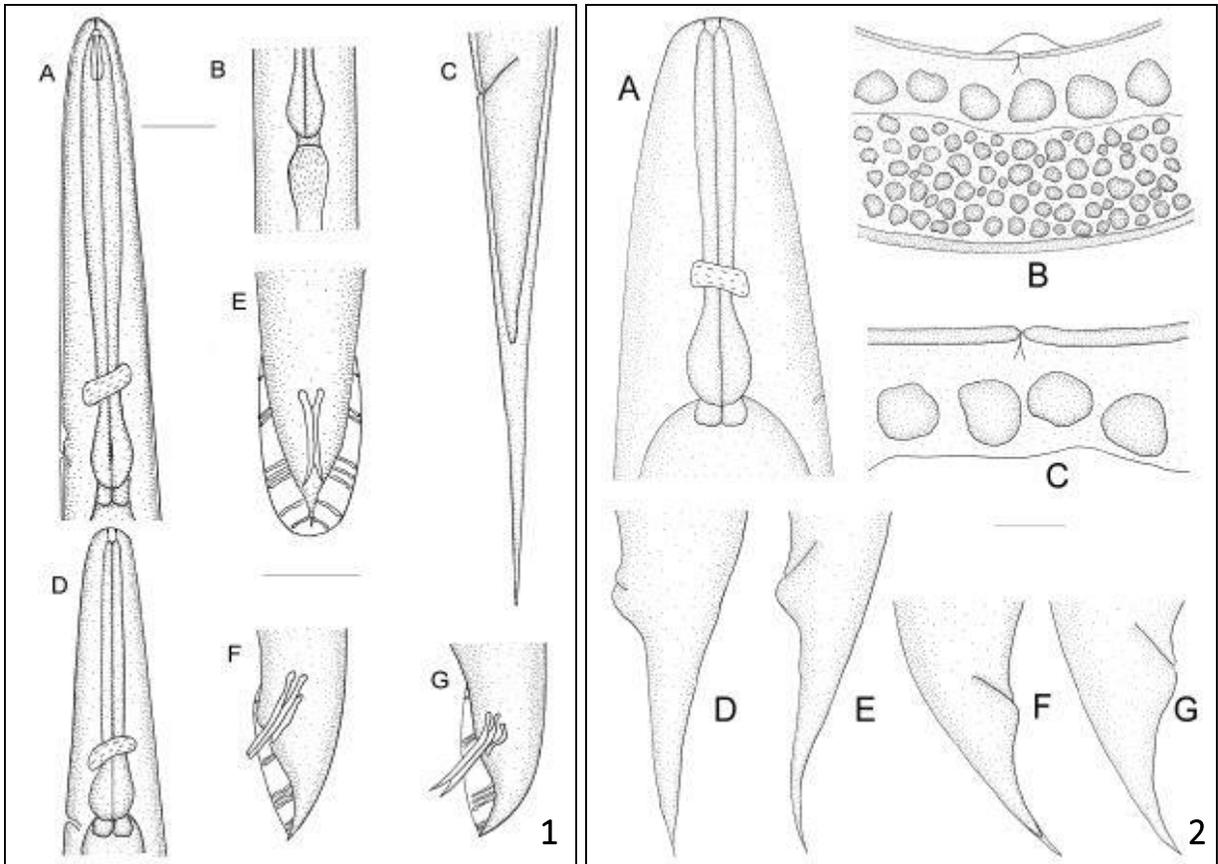
Los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* son los principales nematodos entomopatógenos, y poseen un amplio intervalo de hospedadores; el primero fue descrito y nombrado por Poinar en 1976, mientras que al segundo lo describió Travassos en 1927 (Qiu *et al.*, 2011). Los ciclos de estos nematodos son relativamente simples, presentado huevo y cuatro estadios juveniles antes de ser adultos. Existe un tipo de juvenil denominado infectivo juvenil (IJ), el cual es un tercer estadio que conserva la muda del segundo, lo cual lo hace resistente al ambiente externo (Nicholls, 2008). Además, el IJ porta las bacterias en forma de simbiote y es de vida libre (siendo el único estadio que se encuentra en el suelo). Una de las principales diferencias entre estos nematodos es que los steinernematidos presentan generaciones anfimícticas (se encuentran tanto machos como hembras) dentro del insecto; mientras que, los heterorhabdítidos, presentan la primera generación de adultos hermafroditas, y las siguientes anfimícticas (García, 1994; Gaugler, 2002). Sin embargo, Stock *et al.* (2004) reportaron una especie de *Steinernema* que es hermafrodita en Indonesia, denominada *Steinernema hermaphroditum*.

### **3.6 Taxonomía y morfología de nematodos entomopatógenos**

Según la clasificación clásica, los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema*, pertenecen a la superfamilia Rhabditoidea, suborden Rhabditina, orden Rhabditida, clase Sercenentea, del Phylum Nematoda (reino Animal) (González, 1995). Con base en las relaciones filogenéticas, recientemente estudiadas, pertenecen al Orden Rhabditida, de la Subclase Chromadoria, de la

Clase Chromaderea (Abebe *et al.*, 2006). *Heterorhabditis* (aprox. 10 especies) se encuentra dentro de la familia Heterorhabditidae, mientras que *Steinernema* pertenece a la familia Steinernenematidae, junto con el género *Neosteinerema* (una especie) (Adams *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2011).

En cuanto a los herterorhabdítidos, la morfología general del adulto es: posee una cabeza truncada y ligeramente redondeada, presenta seis labios protuberantes con una papila cada uno; los anfidios se ubican cercanos a la papila labial; tienen queilorhabditones refráctiles que cubren la región anterior, no poseen telorabdiones y los metarhabdiones están fundidos; el bulbo faríngeo está rodeado por la región anterior del intestino; el anillo nervioso rodea el istmo faríngeo; el poro excretor se encuentra posterior al anillo nervioso; con campos laterales y fasmidios inconspicuos. Las hembras poseen ovarios reflejados y anfidélfico; las hembras hermafroditas poseen una vulva abierta funcional para la oviposición, mientras que las bisexuales no; la cola es puntiaguda. El macho tiene un solo testículo, reflejado, con espículas pares y separadas, posee una bursa abierta, con 9 pares de papilas genitales. El juvenil IJ presenta boca y ano cerrados, con faringe e intestino colapsados, cola puntiaguda, estrías en el campo lateral, tienen una porción labial truncada, con una placa cornea en forma de diente en el extremo anterior (González, 1995). Las características generales de *H. amazonensis* se pueden observar en la figura 3.

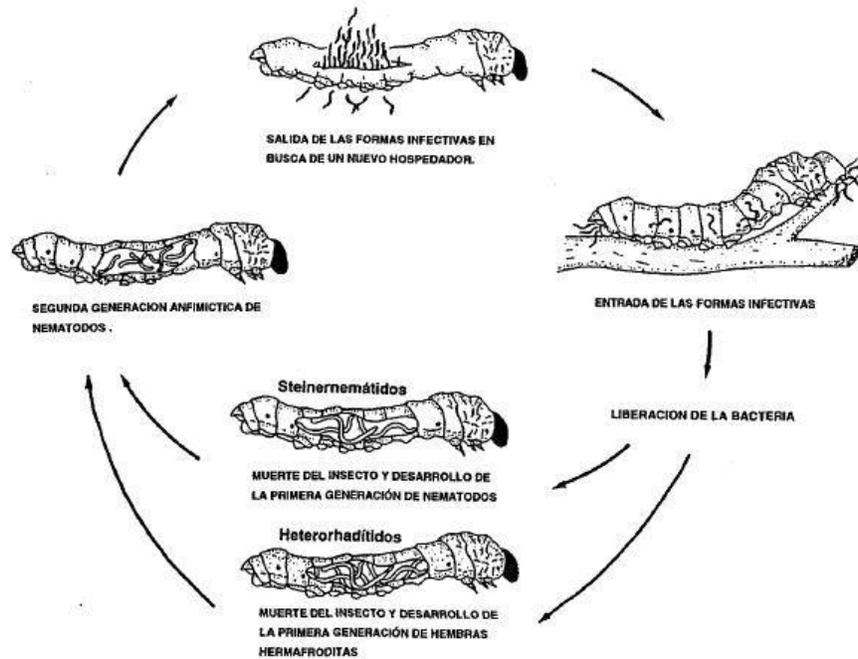


**Figura 3.** *Heterorhabditis amazonensis*. **1:** Región anterior (A), región del bulbo basal (B) y región posterior (C) de IJ. Región anterior (D), región posterior con vista ventral (E) y variaciones de tallo y gubernáculo (F, G) del macho. (Barra de escala: A-C = 14  $\mu$ m, D-G = 41  $\mu$ m.). **2:** Región anterior de la hembra (A). Región vulvar de una hembra anisométrica con exudados cubriendo la vulva (B). Región vulvar (C) y variación del tallo (D, E) de una hembra hermafrodita. Variación del tallo de una hembra anisométrica (F, G). (Barra de escala: A-G = 25  $\mu$ m). Tomado de Andaló *et al.* (2006).

### 3.7 Ciclo biológico de los nematodos entomopatógenos

El ciclo de vida de estos nematodos (Figura 4) posee una fase de vida libre que es la del IJ. Este juvenil reconoce al insecto mediante sustancias químicas producidas por el mismo, como heces o subproductos metabólicos; posteriormente, entra a él a través de los orificios naturales tales como boca, ano y espiráculos, o mediante penetración de la cutícula. Si el nematodo entra a través de la boca o el ano, atraviesa la pared intestinal, y si entra por medio de los espiráculos, atraviesa el epitelio traqueal, hasta llegar al hemocele. Una vez que los nematodos se encuentran en el hemocele, las bacterias son liberadas y se dividen exponencialmente en la hemolinfa; y a

través de la liberación de toxinas y exoenzimas se genera la septicemia. Luego el insecto muere entre las 24 – 72 h. Aunque en este proceso también participan sustancias que son liberadas por los nematodos como factores inmunoinhibidores y otras exotoxinas. El juvenil infectivo pasa a ser un juvenil de cuarto estadio y se alimenta tanto de la bacteria como de los subproductos metabólicos del tejido del insecto degradado por ellas; finalmente, pasa a ser adulto. Luego se da la copulación entre los machos y las hembras, en el caso de los heterorhabdítidos la primera generación son hembras hermafroditas, ovipositan dentro del insecto, los huevos eclosionan, y los individuos pasan sucesivamente a juvenil uno, dos, tres y cuatro, hasta convertirse en adultos de la segunda generación y el ciclo se repite. Estas hembras se aparean con los machos y los huevos colocados eclosionan, mudan sucesivamente para convertirse en juvenil uno y juvenil dos; los juveniles del tercer instar, dejan de alimentarse e incorporan las bacterias en su sistema digestivo, y se convierten en IJ que abandonan el cadáver para hospedar otro insecto. En algunos casos, la segunda generación es suprimida y los descendientes de la primera generación se convierten en juveniles infectivos. Sin embargo, la producción de generaciones sucesivas dependerá de la disponibilidad de recursos alimenticios, así como la concentración de amoníaco dentro del cadáver del insecto, ya que posiblemente se activen señalizaciones en respuesta que controlen la formación del IJ. El ciclo de vida de estos juveniles, en temperaturas óptimas puede durar entre siete y diez días (Smart, 1995; Gaugler, 2002; Hazir *et al.*, 2004; Adams *et al.*, 2006; Lewis *et al.*, 2006; Divya & Sankar, 2009, San-Blas *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Ciclo biológico de nematodos entomopatógenos. Tomado de García (1994).

### 3.8 Biología de la asociación nematodo-bacteria

Por lo general, los heterorhabdítidos, están asociados a diferentes especies de bacterias del género *Photorhabdus*, que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos Gram negativos, anaeróbicos, móviles, huéspedes facultativos y no forman esporas (Hazir *et al.*, 2004). Son varias las relaciones que ambos organismos poseen, los nematodos se alimentan de las bacterias, por lo cual se cumple trofismo en un solo sentido de la asociación; sin embargo, si el nematodo no posee resistencia, las bacterias pueden causar infección en el mismo, otra relación unidireccional. Finalmente, ambos cooperan entre sí (mutualismo) (Dillman *et al.*, 2012), ya que los nematodos portan las bacterias, ofreciéndoles protección, y se alimentan de los tejidos previamente descompuestos producto de la infección (Gaugler, 2002). Además, son capaces de liberar sustancias que destruyen compuestos antibacteriales secretados por el insecto mediante la inmunosupresión, así como exotoxinas paralizantes y enzimas extracelulares citotóxicas y

proteolíticas (Hazir *et al.*, 2004). Las bacterias *Photorhabdus* se encuentran alojadas en el intestino completo, y son liberadas a través de la boca por regurgitación. Se ha descubierto que algunas de estas bacterias son capaces de liberar un factor antifagocítico, y además secretan toxinas y metaloproteasas que le permiten la destrucción del sistema inmune y el intestino medio del insecto. Adicionalmente, las bacterias liberan compuestos antimicrobianos que impiden la colonización de otros organismos (principalmente bacterias y hongos) cuando se acerca el final de su proliferación y/o curva de crecimiento (Adams *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2006).

#### 4. ANTECEDENTES

Aunque los nematodos entomopatógenos son terrestres, se han realizado diversos estudios sobre la patogenicidad de los mismos en insectos acuáticos, como larvas de algunas especies de dípteros pertenecientes a la familia Culicidae. Si bien la mayoría de los estudios de susceptibilidad de estos organismos se han realizado con nematodos entomoparásitos, especialmente *Romanomermis culicivorax* y *Romanomermis iyengari* (Santamarina & Pérez, 1998; Santamarina, 2000; Rodríguez *et al.*, 2005), los primeros han sido propuestos como potenciales biocontroladores de mosquitos.

Poinar & Kaul (1982) fueron uno de los primeros en estudiar la infectividad de nematodos en dípteros, para ello utilizaron larvas de 2do, 3er y 4to estadio de *Culex pipiens* y las sometieron a diferentes concentraciones de *Heterorhabditis bacteriophora*. A las 48 h obtuvieron 100 % de mortalidad con la máxima concentración para las larvas de 3er y 4to estadio, obteniendo CL<sub>50</sub> de 80 y 63 nematodos por larvas, respectivamente; y CL<sub>99</sub> de 170 (3er estadio) y 220 (4to estadio) nematodos por larvas.

Molta & Hominick (1989) evaluaron dosis y tiempos de respuestas a la infección por éstos en larvas de 3er estadio de *Ae. aegypti*. Utilizaron parásitos juveniles infectivos de *Heterorhabditis heliothidis* y *Steinernema feltiae*; y reportaron una mortalidad del 50 % de las larvas (DL<sub>50</sub>) del hospedador con dosis de 141 IJs y 1263 IJs por individuo, respectivamente.

En cuanto a la gama de hospedadores del género *Heterorhabditis*, específicamente *H. bacteriophora*, Doucet & Giayeto (1994) realizaron un estudio con 60 insectos, entre los cuales se encontraban dípteros, expuestos a 10000 nematodos de esta especie en cada ensayo. El porcentaje de susceptibilidad (o infección) para el orden fue de 90 %. Dentro de la familia Culicidae, las especies que mostraron resultados positivos ante la infección fueron *Aedes sierrensis* y *Culex pipiens*. Esto sugiere que este nematodo terrestre podría infectar insectos tanto de su mismo hábitat, como de hábitats acuáticos.

En contraste a lo obtenido en los trabajos anteriores, Oguzoglu & Ozer (2007), realizaron ensayos para evaluar el porcentaje de mortalidad causado por *Steinernema feltiae* y *Heterorhabditis bacteriophora* en diversos insectos, entre los cuales se encontraba *Ae. aegypti*, utilizando como dosis 100 infectivos juveniles por hospedador (100:1) y 50 insectos por ensayo. Los resultados obtenidos para este hospedador fueron insatisfactorios debido a que la mayor mortalidad registrada fue de 1,48 % para el primer patógeno y 3,7 % para el segundo, en un tiempo de 96 h. Los autores mencionan que esto se debe a que hospedador y huéspedes pertenecen a hábitats naturales diferentes, lo cual los convierte en especies inadecuadas para el control. Esto podría deberse a la concentración de nematodos utilizada, la cual es baja para desarrollar una infección.

Maharmart (2008) evaluó la eficiencia de *Steinernema carpocapse* y *Heterorhabditis indica* contra *Culex gelidius*. Para ello, utilizó larvas del 3er y 4to instar del hospedador, lo cual le permitió determinar la diferencia en susceptibilidad entre ambos estadios, además de determinar la diferencia entre la eficiencia de ambos géneros. En cuanto al porcentaje de infectividad *S. carpocapse* mostró un 63%, mientras que con *H. indica* obtuvo un eficiencia de 13 %. No hubo diferencias significativas entre los estadios del hospedador. Sin embargo, la dosis letal para el 50 % de los individuos se encuentra entre 2000:1 – 4000:1, para el nematodo entomopatógeno más efectivo. Con ello se considera al mismo un potencial biocontrol contra *Cx. gelidius*.

Cagnolo & Almirón (2010), realizaron ensayos con *Culex apicinus* exponiendo larvas del 2do instar a concentraciones de 1:1, 5:1, 15:1, 100:1 y 400:1 del nematodo *Steirnerema rarum*. Cada ensayo fue realizado con 50 larvas del hospedador. El porcentaje de mortalidad obtenido fue de 75 % en la dosis más alta. La mayoría de las muertes fueron observadas entre el segundo y tercer día. Estos resultados constatan que los nematodos entomopatógenos pueden infectar tanto a insectos terrestres como a insectos acuáticos.

Ulvedal (2012) en un estudio de infectividad de *H. bacteriophoraen* larvas de *Ae. aegypti* y *Culex quinquefasciatus*, expone los resultados para la patogenicidad de larvas de 2do estadio de estos organismos hospedadores bajo la inoculación de diferentes concentraciones (0:1, 5:1, 15:1, 100:1, 500:1, 700:1 y 1500:1) del nematodo entomopatógeno; y reporta la mayor mortalidad en la dosis 1500:1, obteniendo un porcentaje de infectividad de 80 % para *Cx. quinquefasciatus* y de 92,5 % para *Ae. aegypti*. Lo cual sugiere que ambas especies son susceptibles al parasitismo por el nematodo y que éste podría utilizarse como un potencial biocontrol para los mismos.

Zohdy *et al.* (2013) expusieron larvas de *Culex quinquefasciatus* de 2do, 3er y 4to instar a infectivos juveniles de *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. indica*, *Steinernema carpocapsae* y *S. feltiae* en condiciones de laboratorio. Para evaluar susceptibilidad del mosquito (1:1), e infectividad y fecundidad de los nematodos (50:1, 100:1, 150:1, 200:1, 250:1 y 300:1). Los resultados de los bioensayos revelaron el papel supresor de *H. bacteriophora* y *H. indica* en el control del mosquito; ya que se desarrollaron con éxito en el cadáver de la larva y produjeron juveniles infectivos. Por otro lado, con *S. carpocapsae* y *S. feltiae* no se obtuvieron valores significativos de mortalidad, y los nematodos no se establecieron en las larvas ni produjeron infectivos juveniles.

En *Ae. albopictus* solamente se ha evaluado el control con nematodos entomoparásitos: Paily *et al.* (2013) evaluaron *Romanomermis iyengari* en huecos de árboles en donde se encontraban larvas de *Ae. albopictus*, bajo concentraciones de 1:3 y 1:4 y tras 7 días de la aplicación encontraron que las tasas de infección en los diferentes estadios larvales de mosquitos fueron similares, entre 85,7 % - 95,8 % del primer al tercer estadio y 79,3 % en cuarto estadio larval, para la concentración 1:3, o 100 % y 92,9 %, respectivamente para la concentración 1:4. Bajo la concentración de 1:3 la carga parasitaria varió desde 1,1 hasta 2,4 entre el primer y tercer estadio larval; mientras que bajo la concentración 1:4 la carga parasitaria estuvo entre 1,6 (4to estadio) y 4 (2do estadio). Lo que confirma la eficacia de la *R. iyengari* en el control del mosquito. Sin embargo, los nematodos entomoparásitos sólo pueden ser cultivados *in vivo* (Platzer, 2007), mientras que los nematodos entomopatógenos pueden cultivarse tanto *in vivo* como *in vitro* (Divya & Sankar, 2009), lo cual representa ventajas en cuanto a la producción masiva de los mismos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Área de experimentación

La investigación se realizó en las instalaciones del cepario del Departamento de Biología de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo, Municipio Naguanagua, estado Carabobo, Venezuela.

### 5.2 Recolecta del insecto hospedador (*Ae. albopictus*)

Para establecer la colonia de *Ae. albopictus* en el cepario, se realizaron recolectas del mismo dentro del campus de la Universidad, específicamente en áreas del Departamento de Biología, y dentro de las áreas del Cementerio municipal de Naguanagua, Edo. Carabobo. Dentro del campus se utilizaron trampas de floreros oscuros con retazos de tela en las paredes con el fin de recolectar los huevos que las hembras colocaron sobre los mismos. Estos contenían una mezcla de agua reposada con material orgánico en descomposición, para semejar las condiciones de los floreros que se encuentran en los cementerios. Los floreros fueron colocados de forma aleatoria en lugares sombreados, húmedos y/o cercanos a vegetación, en árboles o sobre aires acondicionados, y fueron revisados cada 24 h, hasta que se observaron huevos sobre la tela, momento en el cual se retiraron, sin pasar la semana de colocación. Las recolectas en el cementerio municipal de Naguanagua se realizaron sin seguir un orden sistemático, observando los floreros y recolectando larvas en aquellos en donde se encontraron; las mismas fueron extraídas utilizando una perilla de succión (*turkey baster*), se trasvasaron a un envase de plástico, el agua contenida se filtró y las larvas se colocaron dentro de una botella de plástico con agua limpia; en algunas muestras se colocaron directamente de la perilla a una bolsa de muestra de alambre plano (*Whirl pak*).

Las muestras obtenidas en ambos lugares fueron trasladadas al cepario, donde se colocaron en bandejas de plástico con agua reposada, y se taparon con gasa. Las bandejas se revisaron y limpiaron cada 24 h, y las larvas se alimentaron con perrarina sin colorante triturada, en el mismo lapso de tiempo. Los adultos que emergían dentro de las bandejas fueron succionados mediante un dispositivo que constaba una parte de tubo acrílico y otra de una manguera mediante la cual se realizaba la succión. Se revisaron e identificaron utilizando la clave de Rueda (2004), y se separaron según su género y especie.

### **5.3 Reproducción y mantenimiento de *Ae. albopictus***

Para la reproducción del mosquito se siguió el protocolo propuesto en el insectario del Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA), adscrito al Instituto de Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldón” del Ministerio del Poder Popular para la Salud, con modificaciones. Los adultos identificados y separados fueron colocados dentro de una jaula de dopiovelo (30 cm x 30 cm), para mantener la reproducción de la colonia. Dentro de la jaula se colocó un frasco de vidrio con agua azucarada (10 %) y una chupa de algodón y gasa, para alimentar a los machos; y un envase de plástico con papel blanco de oficina en las paredes y agua, para la ovipostura de las hembras. Estas últimas, fueron alimentadas los días lunes, miércoles y viernes con cobayos hembras que se introdujeron dentro de la jaula en bolsas de dopiovelo para limitar su movimiento, durante un período aproximado de 30 min.

Las tiras de huevos de cada ovipostura se retiraban de la jaula y se dejaban secando durante 24 h; luego se almacenaban dentro de bolsas de papel, siendo utilizadas posteriormente para darle continuidad al desarrollo y mantenimiento de la colonia, y para obtener las larvas necesarias para los bioensayos. Para ello se realizaron ensayos de eclosión directa (colocando las tiras de huevos

secas dentro de una bandeja con agua reposada) y de eclosión indirecta (siguiendo el protocolo mencionado anteriormente).

#### **5.4 Nematodos entomopatógenos**

Los nematodos utilizados fueron cepa de *Heterorhabditis amazonensis* del Laboratorio de Protección Vegetal del Centro de Estudios Botánicos y Agroforestales del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), ubicado en Maracaibo, estado Zulia, Venezuela.

#### **5.5 Reproducción de nematodos**

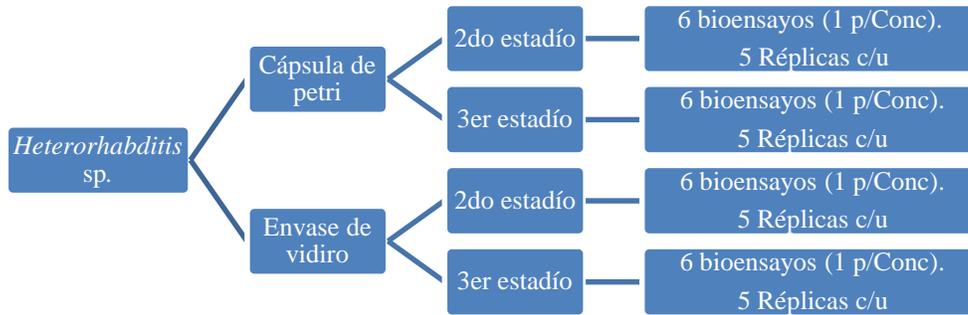
Los nematodos que se utilizaron en los bioensayos fueron aislados y mantenidos siguiendo los protocolos mencionados por Rosales *et al.* (2009) y San-Blas *et al.* (2012), con modificaciones. Los nematodos fueron reproducidos en larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), tomando grupos de 6-10 larvas del insecto y colocándolos en cápsulas de Petri de 10 cm de diámetro con papel de filtro previamente humedecido con 1 mL de suspensión de nematodos. Las placas fueron selladas con parafilm, abriendo dos agujeros para facilitar la circulación del aire, y llevadas a la estufa para mantenerlas una temperatura de 25 °C. Cuando los nematodos IJs comenzaron a emerger de los cadáveres de las larvas (observado con un microscopio estereoscópico), éstas fueron traspasadas a envases de plástico y colocadas sobre una superficie alta cubierta con servilleta que se extendía hasta una solución ringer o agua potable (trampa White); permitiéndoles a los nematodos migrar hasta la solución. Estos envases también fueron almacenados a 25 °C en la estufa. Una vez los nematodos terminaron de salir o cuando la suspensión estuvo altamente concentrada, se procedió a trasvasar la misma a varios envases de plásticos, agregando solución ringer o agua potable a los mismos para diluirla. Las suspensiones finales obtenidas, fueron almacenadas en lugares oscuros a temperaturas entre 25-27 °C.

## **5.6    Conteo de nematodos**

Para obtener las concentraciones de nematodos a utilizar en los ensayos, se realizó un conteo con base en el procedimiento planteado por González (1995), con modificaciones. Este sugiere tomar 1 mL de una suspensión de nematodos y diluirlo en 99 mL de agua (1:100), posteriormente tomar 1 mL de la dilución y realizar conteo de los nematodos presentes. En este caso, no se diluyó la muestra, sino que se procedió a realizar el conteo de los nematodos presentes en la suspensión directamente. Para ello se utilizó una cápsula de Petri de 10 cm de diámetro dividida en cuadrículas, en la cual se colocó la muestra y se observó bajo un microscopio estereoscópico. Luego, utilizando la fórmula de  $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$  (donde, V: volumen y C: concentración), se realizó una estimación de cuántos nematodos se encontraban en la suspensión y se calculó el volumen a extraer de la misma para obtener las concentraciones de nematodos que se utilizaron en los bioensayos.

## **5.7    Bioensayos de patogenicidad**

Los experimentos para evaluar la infectividad de los nematodos sobre *Ae. albopictus* fueron llevados a cabo en cápsulas de Petri de 10 cm de diámetro y 1 cm de profundidad (González, 1995), y en envases de vidrios de compotas de 113 g., en los cuáles se evaluaron 3 cm de profundidad; esto con la finalidad de comparar entre las diferentes profundidades. Las concentraciones de nematodos utilizadas fueron: 20:1, 100:1, 400:1, 600:1, y 1000:1, junto con el control (0:1). En cuanto al organismo hospedador (*Ae. albopictus*), se utilizaron larvas del 2do y 3er estadio, por separado. Cada unidad experimental contuvo 20 larvas del mosquito y se realizaron 5 réplicas por bioensayo. El siguiente esquema (Figura 5) muestra en orden los bioensayos realizados:



**Figura 5.** Esquema resumen de grupos de bioensayos realizados (Total= 120 bioensayos).

Durante la experimentación se mantuvo una temperatura alrededor de los 27 – 29 °C y una humedad relativa de 70 – 80 %. Una vez montados los bioensayos se realizaron observaciones cada 24 h, registrando y extrayendo el número de larvas muertas en este periodo de tiempo; esto se realizó hasta que todas las larvas estuvieron muertas o pasaron a pupas (aproximadamente 7 días). Para verificar la presencia de los nematodos y que la muerte fue producida por los mismos, se disectaron larvas muertas y se observaron en un microscopio estereoscópico.

Durante la realización de los ensayos, las larvas fueron mantenidas en condiciones similares a las de la colonia de *Ae. albopictus*.

## 5.8 Análisis estadísticos

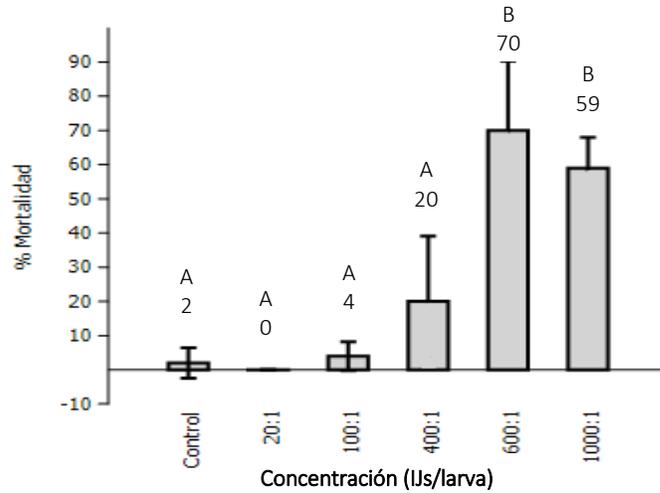
Para evaluar las diferencias en cuanto a la mortalidad causada entre las concentraciones de *H. amazonensis* para cada grupo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía en el programa informativo PAST 3.0, con previo cumplimiento de las premisas de normalidad y homocedasticidad de varianza (Hammer *et al.*, 2001). Para obtener la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) y el tiempo letal 50 (TL<sub>50</sub>), se realizó un cálculo de regresión entre el porcentaje de mortalidad con el logaritmo de las concentraciones utilizadas o del tiempo, mediante un análisis PROBIT (González, 1995; Argotti *et al.*, 2010). Para evaluar las diferencias entre los estadios

larvales (2do y 3er) utilizados y entre las profundidades de los bioensayos, 1 cm (cápsula) y 3 cm (frascos), se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías en el programa informativo PAST 3.0 (Hammer *et al.*, 2001).

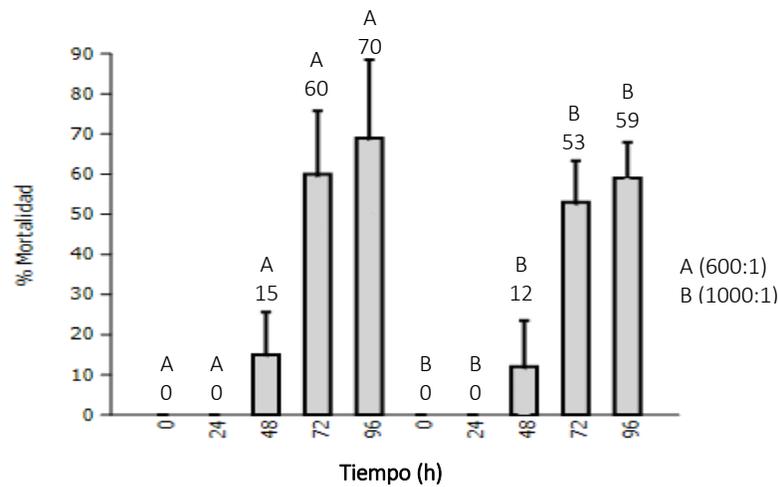
## 6. RESULTADOS

### 6.1 Mortalidad de *Ae. albopictus* para cada grupo evaluado

Para el grupo de larvas de 2do estadio de *Ae. albopictus* en cápsulas (1 cm de profundidad), la figura 6 muestra el porcentaje de mortalidad obtenido con cada una de las concentraciones de IJs de nematodos utilizados. Mortalidades mayores al 50 % se alcanzaron en las concentraciones más altas (600:1 y 1000:1), obteniendo el  $70 \pm 20$  % de mortalidad con 600:1, y  $59 \pm 9$  % de mortalidad con 1000:1. En cuanto a la concentración y tiempo necesarios para obtener la mortalidad del 50 % de las larvas, mediante análisis PROBIT se obtuvo un valor de  $CL_{50} = 618$  IJs y un  $TL_{50} = 71$  h con la concentración de 600:1 y de  $TL_{50} = 78$  h con la concentración de 1000:1, para este grupo. En la figura 7 se pueden observar los porcentajes de mortalidad obtenidos por día, y se puede verificar que los mayores descensos para estas concentraciones ocurrieron a las 72 h, con un incremento de  $45 \pm 16$  % de mortalidad en cada una. Para determinar la existencia de diferencias significativas entre cada una de las concentraciones de IJs utilizados se realizó un test de ANOVA, el cual arrojó un p-valor de  $6,70E-10$  ( $\alpha = 0,05$ ); lo que indica diferencias entre cada una de las concentraciones utilizadas. En la tabla I se pueden observar los resultados del test de Tukey, el cual muestra los tratamientos que difieren entre sí dentro del grupo, confirmando que los tratamientos que presentan diferencias significativas son las concentraciones de 600:1 y 1000:1 respecto a las demás, pero sin diferencias significativas entre ambos.



**Figura 6.** Mortalidad de larvas de 2do estadio de *Ae. albopictus* por infección de *H. amazonensis* a diferentes concentraciones, a 1cm de profundidad (cápsulas). A y B: Presentan diferencias significativas entre sí.

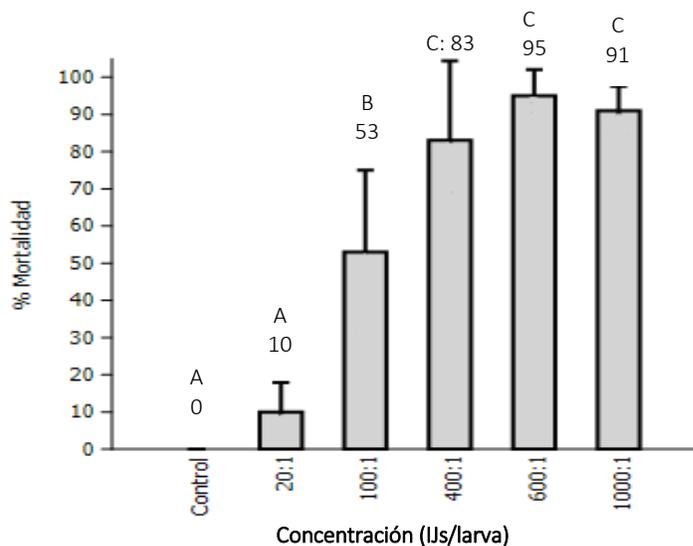


**Figura 7.** Mortalidad de larvas de 2do estadio de *Ae. albopictus* en el tiempo (h), por infección de *H. amazonensis* a concentraciones de 600 IJs y 1000 IJs por larva, a 1cm de profundidad (cápsulas).

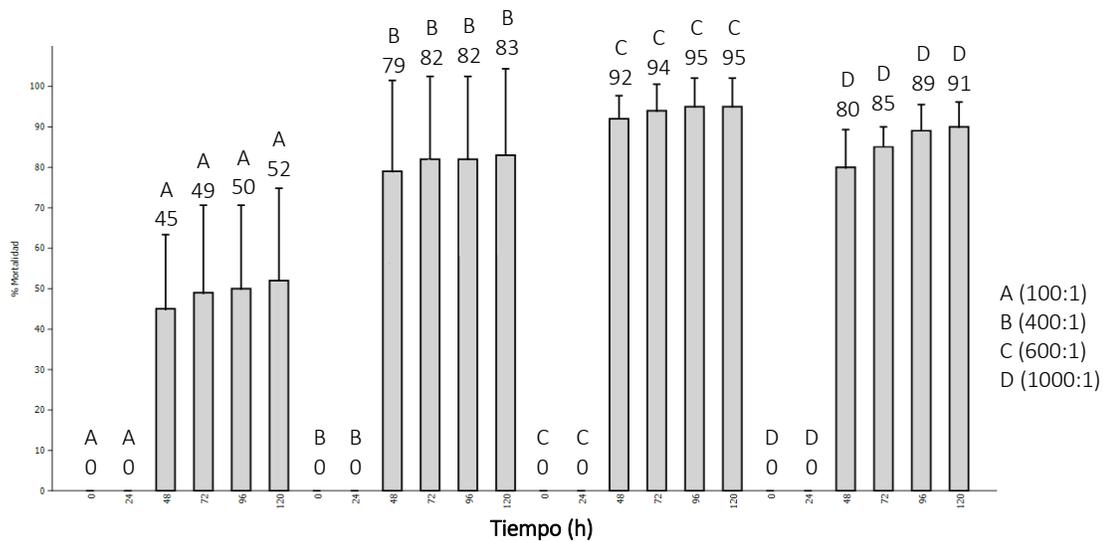
**Tabla I.** Comparaciones pareadas (prueba de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ) entre la mortalidad de larvas de 2do estadio de *Ae. albopictus* causada por diferentes concentraciones de *H. amazonensis*, a 1 cm de profundidad (cápsulas).

Concentración (IJs/Larva)	Control	20:1	100:1	400:1	600:1	1000:1
Control		0,9998	0,9998	0,2199	<b>0,000138</b>	<b>0,0001386</b>
20:1	0,3666		0,995	0,1378	<b>0,000138</b>	<b>0,0001383</b>
100:1	0,3667	0,7333		0,3332	<b>0,000138</b>	<b>0,0001394</b>
400:1	3,3	3,667	2,933		<b>0,000147</b>	<b>0,0005719</b>
600:1	12,47	12,83	12,1	9,167		0,7116
1000:1	10,45	10,82	10,08	7,15	2,017	

En cuanto al grupo de larvas de 3er estadio en cápsulas (1 cm de profundidad), la figura 8 muestra que mortalidades mayores al 50 % se obtuvieron a partir de la concentración de 100:1. Siendo más elevada con la concentración de 600:1 ( $95 \pm 7$  %), seguido de la concentración de 1000:1 ( $91 \pm 7$  %). El valor de la concentración letal para el 50 % de las larvas ( $CL_{50}$ ) obtenido para este grupo, mediante análisis PROBIT, fue de 97 IJs, con una  $CL_{90}=582$  IJs por larva. En cuanto al  $TL_{50}$  los valores obtenidos fueron 54 h bajo una concentración de 100:1, 27 h bajo una concentración de 400:1, 29 h para 600:1 y 36 h para 1000:1. La figura 9 muestra la mortalidad obtenida diariamente bajo estas concentraciones, teniendo el mayor porcentaje de mortalidad a las 48 h en todas las concentraciones, con descensos de  $45 \pm 18$  % para 100:1,  $79 \pm 22$  % para 400:1,  $92 \pm 6$  % para 600:1 y  $80 \pm 9$  % para 1000:1. El test de ANOVA realizado permitió determinar la existencia de diferencias significativas dentro del grupo, bajo un p-valor de  $1,05E-11$  ( $\alpha = 0,05$ ). La tabla II muestra los resultados obtenidos con la prueba de Tukey; en la cual se evidencia que la concentración de 100:1 se diferencia significativamente de todas las demás, no se observan diferencias significativas entre las concentraciones de 400:1, 600:1 y 1000:1; pero si hay diferencias respecto a dichas concentraciones y el resto de las concentraciones evaluadas.



**Figura 8.** Mortalidad de larvas de 3er estadio de *Ae. albopictus* por infección de *H. amazonensis* a diferentes concentraciones, a 1cm de profundidad (cápsulas). A, B y C: Presentan diferencias significativas entre sí.



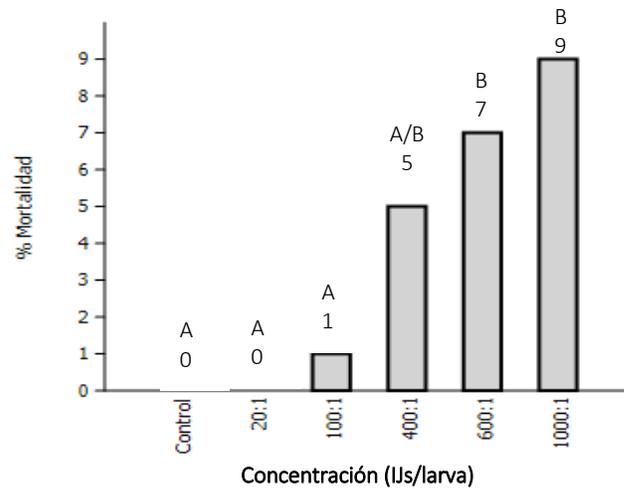
**Figura 9.** Mortalidad de larvas de 3er estadio de *Ae. albopictus* en el tiempo (h), por infección de *H. amazonensis* a diferentes concentraciones, a 1 cm de profundidad (cápsulas).

**Tabla II.** Comparaciones pareadas (prueba de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ) entre la mortalidad de larvas de 3er estadio de *Ae. albopictus* causada por diferentes concentraciones de *H. amazonensis*, a 1 cm de profundidad (cápsulas).

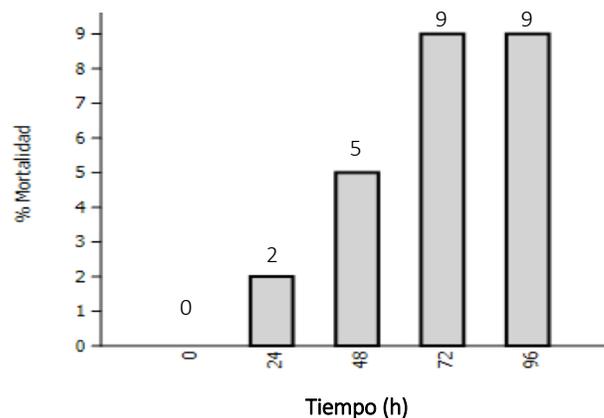
	Control	20:1	100:1	400:1	600:1	1000:1
<b>Control</b>		0,8463	<b>0,0001578</b>	<b>0,000138</b>	<b>0,000138</b>	<b>0,000138</b>
<b>20:1</b>	1,655		<b>0,0006034</b>	<b>0,000138</b>	<b>0,000138</b>	<b>0,000138</b>
<b>100:1</b>	8,773	7,117		<b>0,01972</b>	<b>0,0007756</b>	<b>0,002182</b>
<b>400:1</b>	13,74	12,08	4,966		0,7241	0,933
<b>600:1</b>	15,72	14,07	6,952	1,986		0,9969
<b>1000:1</b>	15,06	13,41	6,29	1,324	0,6621	

Para el grupo de larvas de 2do estadio de *Ae. albopictus* en frascos (3 cm de profundidad), en la figura 10 se puede observar que con ninguna de las concentraciones se obtuvo resultados significativos, ya que los porcentajes de mortalidad fueron menores al 50 %, siendo el más alto alcanzado con la concentración de 1000:1 (9 %) que equivale aproximadamente a 2 larvas muertas de 20. La  $CL_{50}$  obtenida para este grupo fue de 20986 IJs por larva. Mientras que el  $TL_{50}$  fue de 1026 h (43 días) bajo la mayor concentración (1000 IJs/ larva), la mortalidad obtenida diariamente para la misma se muestra en la figura 11, observando el igual descenso (5 %) a las 48 h y 72 h. Sin embargo, a pesar de no tener resultados de mortalidad altos, el test de ANOVA realizado mostró la existencia de diferencias entre las concentraciones utilizadas, bajo un p-valor

de 0,000123 ( $\alpha = 0,05$ ). Los resultados del test de Tukey (tabla III) muestran que las concentraciones de 600:1 y 1000:1 no difieren entre sí, pero si se diferencian del resto del grupo.



**Figura 10.** Mortalidad de larvas de 2do estadio de *Ae. albopictus* por infección de *H. amazonensis* a diferentes concentraciones, a 3cm de profundidad (frascos). A y B: Presentan diferencias significativas entre sí.



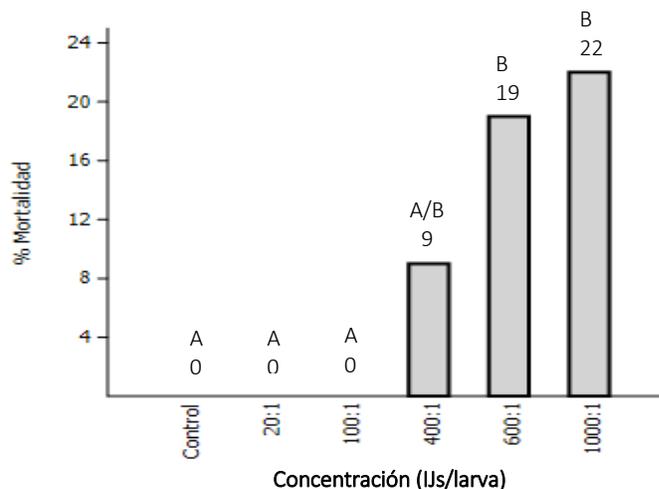
**Figura 11.** Mortalidad de larvas de 2do estadio de *Ae. albopictus* en el tiempo (h), por infección de *H. amazonensis* bajo concentración de 1000 IJs por larva, a 3cm de profundidad (frascos).

**Tabla III.** Comparaciones pareadas (prueba de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ) entre la mortalidad de larvas de 2do estadio de *Ae. albopictus* causada por diferentes concentraciones de *H. amazonensis*, a 3 cm de profundidad (frascos).

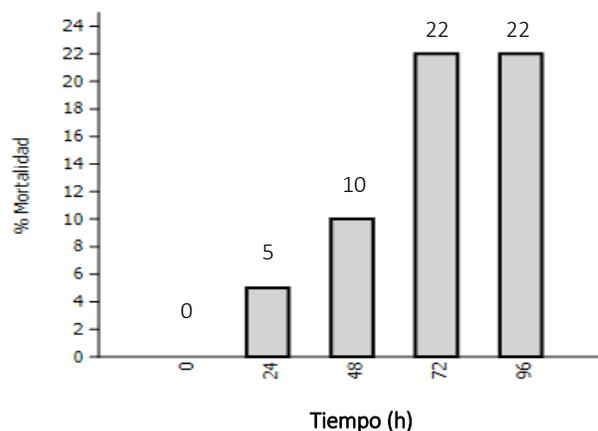
	Control	20:1	100:1	400:1	600:1	1000:1
Control		1	0,9948	0,1332	<b>0,01414</b>	<b>0,001226</b>
20:1	0		0,9948	0,1332	<b>0,01414</b>	<b>0,001226</b>
100:1	0,7384	0,7384		0,326	<b>0,04581</b>	<b>0,004124</b>
400:1	3,693	3,693	2,954		0,898	0,326
600:1	5,17	5,17	4,431	1,477		0,898
1000:1	6,647	6,647	5,908	2,954	1,477	

En cuanto a las larvas de 3er estadio en frascos (3 cm de profundidad), los porcentajes de mortalidad obtenidos también fueron menores a 50 % (Figura 12), la mayor mortalidad se obtuvo bajo la concentración de 1000:1 (22 %), seguida de la concentración de 600:1 (19 %); lo cual equivale aproximadamente a 4 larvas muertas de 20, en ambos casos. El número de nematodos necesarios para obtener 50 % de mortalidad de la población ( $CL_{50}$ ) es de 6174 IJs. El  $TL_{50}$  para la mayor concentración (1000 IJs/ larva) es de 331 h (14 días), en la figura 13 se pueden observar los porcentajes de mortalidad obtenidos diariamente bajo esta concentración, y se puede constatar que el mayor descenso (10 %) ocurrió a las 72 h.

El test de ANOVA realizado para este grupo mostró un p-valor de 3,86E-05 ( $\alpha = 0,05$ ), indicando la existencia de diferencias significativas entre las concentraciones de IJs. Los resultados del test de Tukey (tabla IV) muestran que las concentraciones de 600:1 y 1000:1 se diferencian de las demás utilizadas, pero no muestran diferencias significativas entre sí.



**Figura 12.** Mortalidad de larvas de 3er estadio de *Ae. albopictus* por infección de *H. amazonensis* a diferentes concentraciones, a 3cm de profundidad (frascos).



**Figura 13.** Mortalidad de larvas de 3er estadio de *Ae. albopictus* en el tiempo (h), por infección de *H. amazonensis* bajo concentración de 1000 IJs por larva, a 3cm de profundidad (frascos).

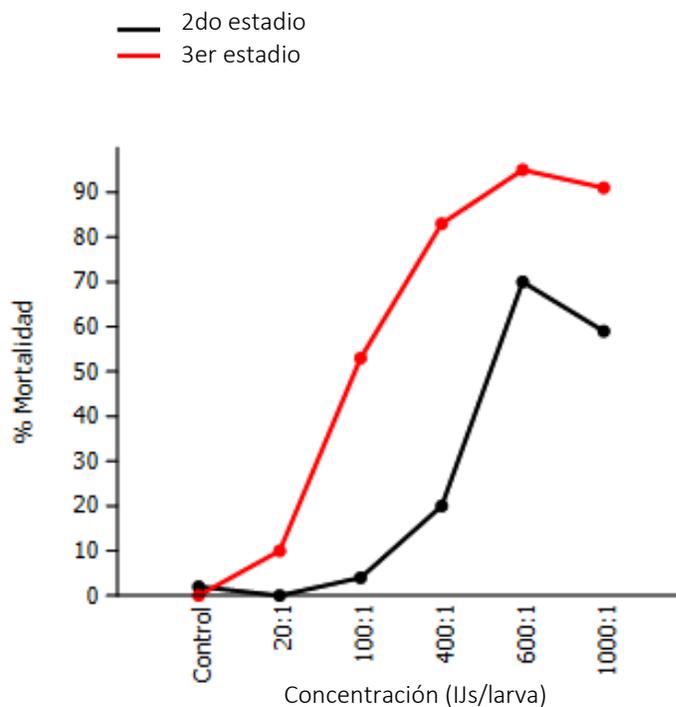
**Tabla IV.** Comparaciones pareadas (prueba de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ) entre la mortalidad de larvas de 3er estadio de *Ae. albopictus* causada por diferentes concentraciones de *H. amazonensis*, a 3 cm de profundidad (frascos).

	Control	20:1	100:1	400:1	600:1	1000:1
Control		1	1	0,3949	<b>0,00462</b>	<b>0,001026</b>
20:1	0		1	0,3949	<b>0,00462</b>	<b>0,001026</b>
100:1	0	0		0,3949	<b>0,00462</b>	<b>0,001026</b>
400:1	2,766	2,766	2,766		0,2861	0,08734
600:1	5,84	5,84	5,84	3,074		0,9855
1000:1	6,763	6,763	6,763	3,996	0,9222	

## 6.2 Diferencias entre grupos evaluados

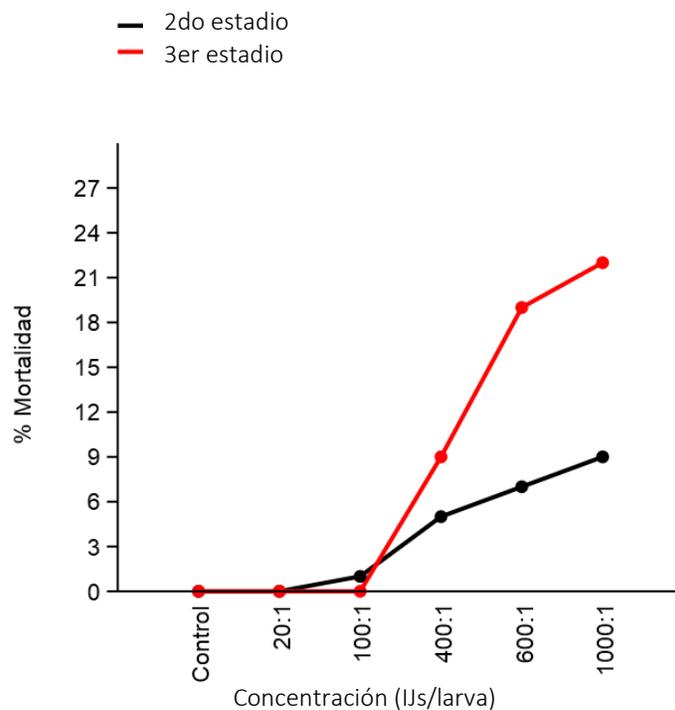
Para determinar las diferencias entre los grupos evaluados se realizaron pruebas de ANOVA de dos vías, con la finalidad de incluir tanto la variable de concentración (presente dentro de cada grupo) con los valores de 0:1 (control), 100:1, 400:1, 600:1 y 1000:1 IJs por larva; así como la variable añadida (la distinción entre grupos). Las comparaciones que se realizaron fueron entre los estadios (2do y 3er) y entre las profundidades (cápsulas-1cm y frascos-3cm), teniendo las siguientes combinaciones: Comparación entre larvas de 2do y 3er estadio en cápsulas, entre larvas de 2do y 3er estadio en frascos, entre larvas de 2do estadio en cápsulas y frascos, y entre larvas de 3er estadio en cápsulas y frascos.

Para la comparación de la mortalidad entre larvas de 2do y 3er estadio en cápsulas (1 cm de profundidad), el p-valor obtenido fue de  $1,07E-11$  ( $\alpha = 0,05$ ), demostrando que hay diferencias significativas entre uno y otro. Esto se puede evidenciar mejor en la figura 14, donde se observan las curvas de mortalidad para ambos estadios. Encontrándose diferencias de 10 % de mortalidad para la concentración de 20:1, 49 % para 100:1, 63 % para 400:1, 25 % para 600:1 y 32 % para 1000:1, siendo mayor la mortalidad producida en larvas de 3er estadio, para todas las concentraciones. En cuanto a las diferencias entre las concentraciones, se obtuvo un p-valor de  $3,01E-21$  ( $\alpha = 0,05$ ), lo cual se pudo evidenciar en los análisis de cada grupo, encontrándose que existen diferencias significativas entre las mortalidades producidas a diferentes concentraciones de IJs de nematodos. El p-valor obtenido en el análisis de la interacción entre ambas variables fue de  $5,86E-06$  ( $\alpha = 0,05$ ), demostrando que las variables son independientes entre sí.



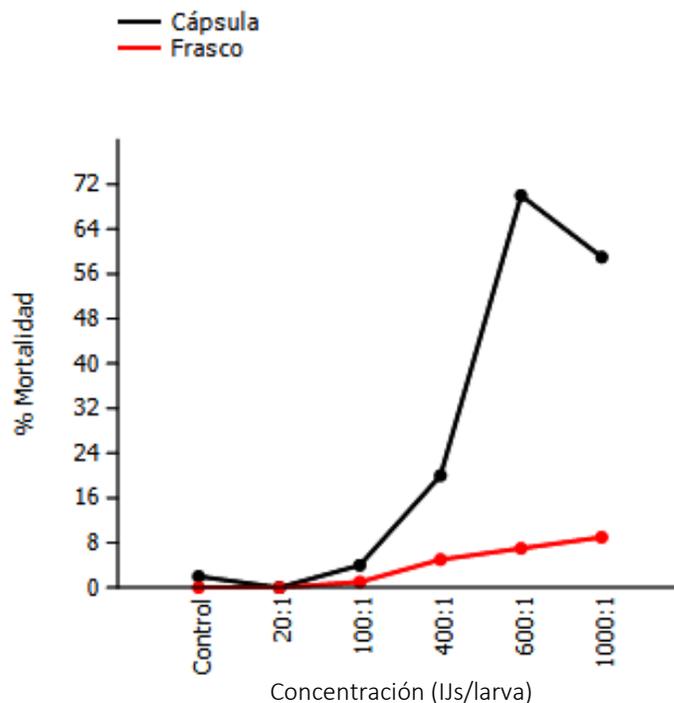
**Figura 14.** Mortalidad de larvas de 2do y 3er estadio de *Ae. albopictus* por infección de *H. amazonensis* a diferentes concentraciones, a 1 cm de profundidad (cápsulas).

Para la comparación de la mortalidad entre larvas de 2do y 3er estadio en frascos (3 cm de profundidad), el p-valor obtenido fue de 0,00215 ( $\alpha = 0,05$ ), demostrando que hay diferencias significativas entre uno y otro. Esto se puede evidenciar mejor en la figura 15, donde se observan las curvas de mortalidad para ambos estadios. Encontrándose diferencias de 1 % de mortalidad para la concentración de 100:1 (siendo mayor en el 2do estadio), 4 % para 400:1, 12 % para 600:1 y 13 % para 1000:1, siendo mayor la mortalidad producida en larvas de 3er estadio, en estos 3 últimos casos. En cuanto a las diferencias entre las concentraciones, se obtuvo un p-valor de 4,12E-09 ( $\alpha = 0,05$ ), lo cual se pudo evidenciar en los análisis de cada grupo, encontrándose que existen diferencias significativas entre las mortalidades producidas a diferentes concentraciones de IJs de nematodos. El p-valor obtenido en el análisis de la interacción entre ambas variables fue de 0,014 ( $\alpha = 0,05$ ), demostrando que las variables son independientes entre si.



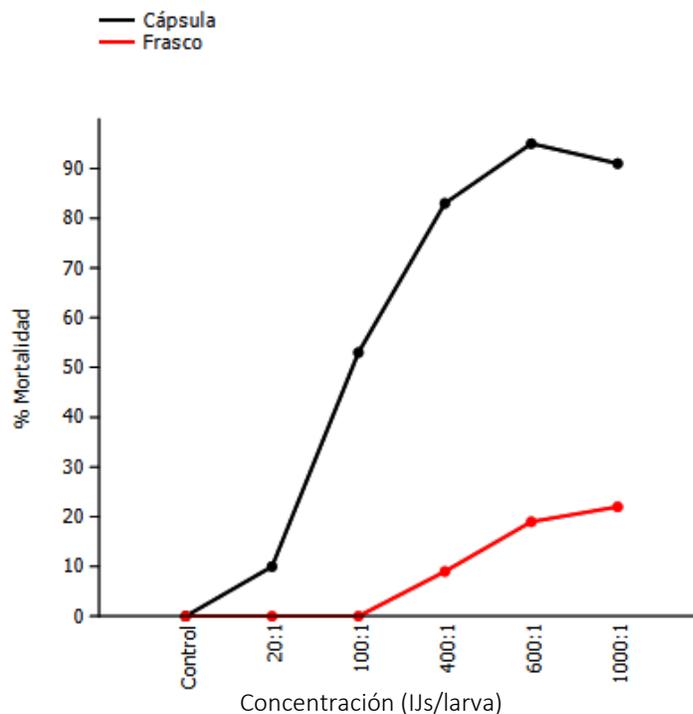
**Figura 15.** Mortalidad de larvas de 2do y 3er estadio de *Ae. albopictus* por infección de *H. amazonensis* a diferentes concentraciones, a 3cm de profundidad (frascos).

En cuanto a la comparación de la mortalidad de larvas colocadas a diferentes profundidades (cápsulas-1 cm y frascos-3 cm), para las larvas de 2do estadio se obtuvo p-valor de 7,72E-13 ( $\alpha = 0,05$ ), lo que sugiere que existen diferencias significativas entre las mortalidades producidas a diferentes profundidades. Esto se puede evidenciar mejor en la figura 16, donde se observan las curvas de mortalidad para ambos casos. Encontrándose diferencias de 3 % de mortalidad para la concentración de 100:1, 15 % para 400:1, 63 % para 600:1 y 50 % para 1000:1, siendo mayor la mortalidad producida a 1 cm de profundidad (en cápsulas). En cuanto a las diferencias entre las concentraciones, se obtuvo un p-valor de 1,49E-15 ( $\alpha = 0,05$ ), lo cual se pudo evidenciar en los análisis de cada grupo, encontrándose que existen diferencias significativas entre las mortalidades producidas a diferentes concentraciones de IJs de nematodos. El p-valor obtenido en el análisis de la interacción entre ambas variables fue de 5,93E-12 ( $\alpha = 0,05$ ), demostrando que las variables son independientes entre sí.



**Figura 16.** Mortalidad de larvas de 2do estadio de *Ae. albopictus* por infección de *H. amazonensis* a diferentes concentraciones, a 1 cm (cápsula) y 3cm (frasco) de profundidad.

En la comparación de larvas de 3er estadio colocadas a diferentes profundidades (cápsulas-1 cm y frascos-3 cm), se obtuvo un p-valor de 1,03E-21 ( $\alpha = 0,05$ ), que sugiere que existen diferencias significativas entre las mortalidades producidas a diferentes profundidades. Esto evidencia en la figura 17, donde se observan las curvas de mortalidad registradas en ambas profundidades. Encontrándose diferencias de 10 % de mortalidad para la concentración de 20:1, 53 % para 100:1, 74 % para 400:1, 76 % para 600:1 y 69 % para 1000:1, siendo mayor la mortalidad producida a 1 cm de profundidad (en cápsulas). En cuanto a las diferencias entre las concentraciones, se obtuvo un p-valor de 1,25E-18 ( $\alpha = 0,05$ ), lo cual se pudo evidenciar en los análisis de cada grupo, encontrándose que existen diferencias significativas entre las mortalidades producidas a diferentes concentraciones de IJs de nematodos. El p-valor obtenido en el análisis de la interacción entre ambas variables fue de 4,90E-12 ( $\alpha = 0,05$ ), demostrando que las variables son independientes entre sí.



**Figura 17.** Mortalidad de larvas de 3er estadio de *Ae. albopictus* por infección de *H. amazonensis* a diferentes concentraciones, a 1 cm (cápsulas) y 3cm (frascos) de profundidad.

## 7. DISCUSIÓN

Los resultados muestran que es posible la infectividad de *Ae. albopictus* con *H. amazonensis* en condiciones de laboratorio, obteniéndose mortalidades considerables con las dosis más altas a bajas profundidades. Coincidiendo con estudios realizados anteriormente; ya que cuando aumenta la concentración de IJs, hay más probabilidades de encuentro larva-nematodos, más nematodos son ingeridos y llegan a la cavidad corporal (Poinar & Kaul, 1982). Los resultados obtenidos para las larvas evaluadas en cápsulas difieren de lo encontrado por Maharmart (2008), ya que la infectividad registrada para *Heterorhabditis indica* fue de 13 % bajo una concentración de 1500:1 para larvas de *Culex gelidius* de 3er y 4to estadio. Pero coinciden con los obtenidos por Poinar & Kaul (1982) que reportaron CL<sub>50</sub> de *H. bacteriophora* de 80 IJs por larva de 2do estadio y 63 IJs por larva de 3er estadio de *Cx. pipiens*. Molta & Hominick (1989) reportaron una DL<sub>50</sub> de 141 IJs de *H. heliothidis* en larvas de 3er estadio de *Aedes aegypti*. Doucet & Giayeyto (1994) reportaron 90 % de mortalidad para culícidos expuestos a 10000 IJs de *H. bacteriophora*. Cagnolo & Almirón (2010), obtuvieron un 75 % de mortalidad en larvas de 2do estadio de *Cx. apicinus* bajo la dosis de 400:1 IJs de *Steinernema rarum*. Ulvedal (2012) obtuvo 92,5 % de mortalidad en larvas de 2do estadio de *Ae. aegypti*, bajo una concentración de 1500 IJs de *H. bacteriophora* por larva. Y finalmente, Zohdy *et al.* (2013) obtuvieron resultados de infectividad de 20 % para *H. bacteriophora* y 10 % *H. indica* en ensayos 1:1 con *Cx. quinquesfasciatus*. Mortalidades de 55 %, 90,9% y 96 % para larvas de 2do, 3er y 4to estadio de *Cx. quinquesfasciatus*, respectivamente bajo una concentración de 300 IJs de *H. bacteriophora* por larva. Resultados comparables con los obtenidos en este trabajo.

En cuanto al tiempo de mortalidad, resultados similares los obtuvieron Sepulveda *et al.* (2008) quienes al evaluar la patogenicidad de *H. bacteriophora* y *S. carpocapse* en larvas y adultos de *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Dryophthoridae), obtuvieron que la mortalidad se registró a partir de las 48 h, con incrementos bajos luego de las 120 h en adultos; en las larvas, las mortalidades más altas se registraron entre las 36 – 48 h, sin variar significativamente hasta las 120 h. Zohdy *et al.* (2013) obtuvieron mortalidades máximas (96,0% y 80,0%) en larvas de 4to estadio de *Cx. quinquefasciatus* a las 48 h de exposición a 300 IJs de *H. bacteriophora* y *H. indica*, por larva, respectivamente. Esto sucede porque una vez el nematodo está dentro del insecto las bacterias son liberadas y se reproducen en el hemocele, provocando la muerte del insecto en un período alrededor de las 48 h (Poinar & Kaul, 1982).

Las diferencias entre las mortalidades de los estadios larvales, podría deberse al tamaño de las larvas de mosquito y de su aparato bucal, debido a que el 3er estadio tiene un mayor tamaño, la infectividad en este estadio es mayor. Estudios realizados demuestran que las larvas de 2do estadio de *Cx. pipiens* pueden ingerir partículas de aproximadamente 50  $\mu$  de diámetro, mientras que las de 3er estadio pueden ingerir partículas de aproximadamente 100  $\mu$  de diámetro (Dadd, 1971). Algunos registros de tamaño de IJs de diferentes especies del género *Heterorhabditis* muestran que la longitud del cuerpo varía entre los 500  $\mu$  y los 800  $\mu$ ; pero en cuanto al mayor diámetro del cuerpo, las longitudes varían entre los 22–24  $\mu$  (*H. amazonensis*), 18–31  $\mu$  (*H. bacteriophora*), 27–32  $\mu$  (*H. megidis*), 22–30  $\mu$  (*H. zealandica*), 24–32  $\mu$  (*H. marelatus*), 21–28  $\mu$  (*H. hawaiiensis*), 20–24 (*H. brevicaudis*), 19–22  $\mu$  (*H. indica*) y 20-24  $\mu$  (*H. mexicana*) (Gaugler, 2002; Nguyen *et al.*, 2004, Andaló *et al.*, 2006). Estos intervalos se encuentran dentro de las longitudes de ingestión estudiadas tanto en el 2do estadio como en el 3ro; sin embargo, la disminución de tamaño del aparato bucal, afecta la ingestión del nematodo completo y, algunas

veces, en larvas de 2do estadio éstos son aplastados, rompiendo su cutícula y produciendo la muerte de los mismos (Poinar & Kaul, 1982). El hecho de que las larvas de 3er estadio puedan ingerir partículas de mayor tamaño, le da mayor capacidad depredadora sobre las larvas de IJs de *H. amazonensis*.

El descenso de mortalidad obtenido con la mayor concentración en los grupos evaluados en cápsula, muestra que el incremento de la concentración no representa exactamente un aumento en los porcentajes de mortalidad algunas veces (Sepulveda *et al.*, 2008). Esto sucede porque la densidad de nematodos puede afectar; ya que las especies difieren entre sus estrategias y algunas son más susceptibles que otras a este factor. Altas densidades disminuyen la capacidad infectiva de los nematodos, reduce la supervivencia, el tiempo de vida y la fecundidad de los mismos, tanto en *Heterorhabditis* como en *Steinernema*; ya que aumenta la competencia intraespecífica por los nutrientes y el espacio (Selvan *et al.*, 1993). Sin embargo, la diferencia entre la mortalidad producida por ambas concentraciones, no fue significativa en ninguno de los dos estadios de *Ae. albopictus* evaluados en cápsulas y la CL<sub>50</sub> estuvo por debajo de la mayor concentración utilizada.

En cuanto a la profundidad, el no haber obtenido resultados considerables en frascos podría deberse a que uno de los factores de los cuales depende la infectividad es la ecología, ya que condiciones como la distribución espacio-tiempo y hábitos alimenticios del insecto afectan el encuentro larva-nematodo (Doucet & Giayeito, 1994). Yee *et al.* (2004b), compararon el comportamiento de alimentación de *Culex pipiens*, *Ae. albopictus* y *Ae. triseriatus* (del género *Aedes*) a través de la observación de las actividades y las posiciones de las larvas. Encontraron que la primera especie estaba asociada a la superficie y permanecía en reposo cuando se

alimentaba; mientras que las dos especies de *Aedes* estaban asociadas al fondo o al medio de la columna de agua, característico del comportamiento de forrajeo. Sin embargo, *Ae. albopictus* pasaba menor tiempo filtrando en el medio y en el fondo de la columna de agua que *Ae. triseriatus*, y fue la especie que mostró un mayor nivel de movimientos tanto de navegación, impulsados por los movimientos del aparato bucal cuando se alimentaba, como movimientos por impulsión propia, realizados con su propio cuerpo. Fue la especie que pasó menos tiempo en reposo, lo cual puede limitar el encuentro con otras especies debido al cambio en su distribución espacial por su constante movimiento (Kesavaraju & Juliano, 2004), pero favorece el encuentro con mayor número de especies a lo largo de la columna de agua. Aunque este comportamiento puede variar en medios diferentes, en presencia de nutrientes líquidos en lugar de detrito, *Ae. albopictus* puede pasar más tiempo en la superficie. Y comparándolo con otras especies aedinas, este mosquito muestra diferentes tipos de actividades de alimentación, siendo menor respecto a *Ae. japonicus* y mayor respecto a *Ae. aegypti*, lo cual puede estar sujeto a la disponibilidad de alimentos, a la presencia de competidores y otros factores ecológicos, indicando que ajusta su estrategia dependiendo de éstos y haciéndolo un competidor superior frente a las otras especies (Yee *et al.*, 2004a, O'Donnell & Armbruster, 2007). Esto podría explicar las diferencias obtenidas entre las dos profundidades, ya que al tener una columna de agua mayor (3 cm) su movimiento es más libre y podría pasar mayor tiempo a través de la misma; mientras que a una baja profundidad, el movimiento es menor, pasa mayor tiempo en el fondo, ajustando su estrategia a la condiciones, y aumentando las posibilidades de encuentro larva-nematodo.

Entre las condiciones que afectan el comportamiento de *Ae. albopictus*, el tipo de detrito y la disposición del mismo tienen mayor efecto en hembras que en machos. Lo cual podría estar relacionado a los papeles fisiológicos después de la emergencia y diferencias en su metabolismo;

ya que las hembras necesitan mayor tiempo de desarrollo para acumular nutrientes suficientes para el desarrollo de huevos y su oviposición, condicionando el desarrollo de las larvas (Dieng *et al.*, 2002). Esto podría significar diferencias en los bioensayos debido a que no se estiman los porcentajes de machos y hembras en los mismos; además, podría significar que la hembra, al necesitar de más recursos alimenticios, tenga mayor contacto con los nematodos e ingiera mayor cantidad que los machos.

Comparando con la mortalidad de *Ae. albopictus* producida por *Romanomermis iyengari* (nematodo entomoparásito), la cual va desde 85 – 95,8 % (larvas de 1er-3er estadio) y 79,3 % (larvas de 4to estadio) bajo concentración de 3 parásitos por larva; y 100 % (larvas de 1er – 3er estadio) y 92,9 % (larvas de 4to estadio) bajo concentración de 4 parásitos por larva (Paily *et al.*, 2013), se observa que es similar a la obtenida en este trabajo, pero con concentraciones más bajas. Sin embargo, los nematodos entomopatógenos tienen características que les dan ventaja sobre los entomoparásitos, como la capacidad de reproducirse en otros huéspedes y en medio artificial, la supervivencia de los IJs que pueden durar de 3 a 6 meses almacenados bajo las condiciones adecuadas (Poinar & Kaul, 1982), la producción masiva de los mismos a bajos costos, ya que pueden obtenerse miles de IJs en un ciclo reproductivo, y mantenimiento de alta infectividad a temperaturas entre 21 – 25 °C (Cagnolo & Almirón, 2010).

## 8. CONCLUSIONES

Este estudio preliminar permite concluir que es posible la infectividad de *H. amazonensis* en larvas de *Ae. albopictus* en condiciones de laboratorio. Siendo esto dependiente de las concentraciones y densidades de los nematodos, el tamaño y la ecología del huésped, principalmente su comportamiento alimenticio, el tiempo de exposición a los nematodos, entre otros.

Concentraciones elevadas (600 y 1000 IJs/larva) permiten obtener mayores resultados de mortalidad debido a que al aumentar las concentraciones de los mismos aumenta la probabilidad de encuentro nematodo-larva.

Altas densidades pueden inducir la competencia intraespecífica de los nematodos, disminuyendo la capacidad infectiva de los mismos y reduciendo la mortalidad del huésped.

Los tiempos en los cuales se consiguen resultados significativos de mortalidad son cortos, aproximadamente 48 h y 72 h; debido a la rapidez con la cual las bacterias se reproducen y la efectividad de la infección que le producen al huésped.

El grupo en el cuál se obtuvo mayor mortalidad fue el de larvas de 3er estadio de *Ae. albopictus* en cápsulas, con  $CL_{50}$  de 97 IJs por larvas, y alcanzado mortalidades de 95 % y 91 % bajo concentraciones de 600 y 1000 IJs por larva, respectivamente. Además, obtuvo el menor tiempo de mortalidad, registrando la mayor descendencia a las 48 h y con un  $TL_{50}$  entre 27 h y 36 h para ambas concentraciones.

Las larvas de 3er estadio *Ae. albopictus* son más propensas a una mayor infectividad que las de 2do estadio, ya que su mayor tamaño facilita la ingestión de los nematodos y la supervivencia de éstos dentro de las mismas, generando mayor mortalidad en este grupo.

Bajas profundidades de agua limitan la capacidad motora de larvas de *Ae. albopictus* y permiten el aumento de encuentros nematodo-larva, obteniendo así mayores porcentajes de mortalidad en ambientes donde la columna de agua es de menor tamaño.

Los nematodos entomopatógenos podrían emplearse como herramienta adicional en el control integrado de especies de dípteros de importancia en la salud pública, como es el caso de *Aedes albopictus*. Sin embargo, por ser este un estudio preliminar, se realizan las siguientes recomendaciones.

## 9. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios futuros de infectividad de *H. amazonensis* sobre *Ae. albopictus* bajo las concentraciones que fueron efectivas en este trabajo (600:1 y 1000:1), incluyendo otras que se encuentren dentro de ese intervalo para poder obtener las dosis letales (DL<sub>50</sub> y DL<sub>90</sub>). Así como evaluar diferentes niveles de profundidad y establecer un punto máximo en la columna de agua en el cual el bioensayo es efectivo.

Se recomienda realizar estudios con larvas de 3er y 4to estadio de *Ae. albopictus* bajo concentraciones efectivas de *H. amazonensis*, para evaluar si existen diferencias significativas entre las mortalidades que se producen en ambos estadios.

Se recomienda llevar este estudio a condiciones de campo, evaluando las concentraciones de nematodos entomopatógenos que produjeron muertes significativas en larvas de 2do y 3er estadio de *Ae. albopictus*, para evaluar si son efectivos bajo dichas condiciones, debido a que los resultados obtenidos en este trabajo fueron bajo condiciones de laboratorio.

Se recomienda repetir este estudio con *Steinernema* sp. para evaluar la infectividad del mismo en larvas de 2do y 3er estadio de *Ae. albopictus* y comparar los resultados con los obtenidos en este trabajo, ya que de esa forma se podría dilucidar cuál de las dos especies produce mayor mortalidad en las larvas de este mosquito y serviría como estudio preliminar para esa especie.

En cuanto a la recolección de larvas o huevos de mosquitos en campo, se recomienda una revisión controlada de las larvas y un ingreso a las jaulas de adultos luego de su emergencia, ya

que esto permitirá una separación más rápida y efectiva del material biológico obtenido en el campo. Esto debido a que las diferencias entre las larvas de diferentes géneros son notables y pueden separarse durante esta etapa, pero las diferencias entre larvas del mismo género son significativas cuando se observan bajo lupa y se compara su quetotaxia, por lo cual la separación debe realizarse cuando son adultos.

Para la cría de mosquitos, se recomienda que la misma se realice bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa, ya que el mantenimiento constante de 27 – 28 °C y 70 – 80 % de humedad relativa permite un mejor establecimiento de la colonia y la obtención de una mayor productividad de la misma. Cambios bruscos en alguno de estos dos factores pueden significar disminución significativa de la puesta de huevos o pérdida total de la colonia.

Así mismo, cuando se tenga la colonia separada y establecida, se recomienda mantener las bandejas en donde se crían las larvas tapadas, esto evitará que mosquitos que estén en la habitación, ya sea porque se escaparon o porque provienen del exterior, ovipongan en estos contenedores y contaminen las generaciones de juveniles que se tienen. De ser posible, es recomendable mantener las larvas y los adultos en habitaciones separadas para controlar esto de mejor manera.

También es recomendable llevar un registro adecuado de las generaciones que se obtienen de cada jaula, para llevar un control del tiempo de cada ovipostura, para su posterior almacenamiento, ya que los huevos de mosquitos solamente son viables durante algunos meses bajo condiciones adecuadas. Sobre el almacenamiento de los huevos, se recomienda que se tengan en un lugar seco pero con flujo constante de aire y a temperaturas no máximas de 28 °C,

ya que de aumentar las mismas los huevos pueden perder su viabilidad. Además deben colocarse en lugares donde no puedan ingresar otros insectos como hormigas que se alimenten del material almacenado.

En cuanto a los nematodos entomopatógenos, los IJs deben almacenarse a temperaturas entre los 20 – 25 °C, ya que temperaturas menores o mayores a este intervalo producirán muerte de los mismos. A bajas temperaturas se inactivan sus funciones fisiológicas, y altas temperaturas las funciones fisiológicas pueden acelerarse a tal punto de agotar su energía, además de favorecer el crecimiento de organismos microscópicos en la solución en donde se encuentran.

Los insectos infectados en los cuales se reproducen deben mantenerse a temperaturas de 25 °C, ya que variaciones en la misma puede afectar el ciclo de los nematodos y producir que éstos se queden dentro del insecto, lo cual conlleva a que no se obtengan los IJs necesarios tanto para el mantenimiento como para los ensayos a realizar.

El agua a utilizar tanto para las trampas White como para el almacenamiento de los IJs, debe ser en lo posible agua destilada combinada con sales (solución ringer específica) para el mantenimiento de estos, se puede utilizar agua potable con poco solutos; pero es recomendable que esta sea autoclavada antes de usarse debido a que aumenta las posibilidades de crecimiento de otros organismos, lo cual puede llevar a la muerte de los IJs.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Abebe, E., I. Andrassy & W. Traunspurger. (2006). *Freshwater Nematodes, Ecology and Taxonomy*. CAB International. Londres.
2. Abebe, E., T. Mekete & W. Thomas. (2011). A critique of current methods in nematode taxonomy. *African Journal of Biotechnology*. 10(3): 312-323.
3. Adams, B., A. Fodor, H. Koppenhöfer, E. Stackebrandt, S. Stock & M. Klein. (2006). Reprint of “Biodiversity and systematics of nematode–bacterium entomopathogens” [Biol. Control 37 (2006) 32–49]. *Biological control*. 38: 4–21.
4. Adhami, J. & P. Reiter. (1998). Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *Journal of American Mosquito Control Association*. 14(3): 340-343.
5. Alarcón-Elbal, P., S. Delacour, R. Pinal, I. Ruiz-Arrondo, A. Muñoz, M. Bengoa, R. Eritja & J. Lucientes. (2010). Establecimiento y mantenimiento de una colonia autóctona española de *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894, (Diptera, Culicidae) en laboratorio. *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología*. 69(2): 140-148.
6. Andaló, V., K. Nguyen & A. Moino. (2006). *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. *Nematology*. 8(6): 853-867.
7. Argotti, E., P. Gallegos., J. Alcazar & H. Kaya. (2010). Patogenicidad de nemátodos entomopatógenos del género *Steinernema* y *Heterorhabditis* sobre larvas de *Tecia solanivora* en Ecuador. *Boletín Técnico 9, Serie Zoológica*. 6: 162-172.
8. Azevedo, R., E. Silva, V. Carvalho, S. Rodrigues, J. Nunes, H. Monteiro, V. Peixoto, J. Chiang, M. Nunes & P. Vasconcelos. (2009). Mayaro Fever Virus, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*. 15(11): 1830-1832.
9. Badii, M., J. Landeros, E. Cerna & J. Abreu. (2007). Ecología e historia del dengue en las Américas. *International Journal of Good Conscience*. 2(2): 248-273.
10. Barrera, R., J. Navarro, J. Mora, D. Domínguez & J. González. (1995). Deficiencia en servicios públicos y cría de *Aedes aegypti* en Venezuela. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*. 118(5): 410-423.

11. Becker, N. & F. Rettich. (1993). Biological control of mosquitoes and flies in the urban environment. Proceedings of the First International Conference on Urban Pests. K.B. Wildey and Wm. H. Robinson (editors). Pp. 455-463.
12. Benedict M., R. Levine, W. Hawley & L. Lounibos. (2007). Spread of the Tiger: Global Risk of Invasion by the Mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 7(1): 76–85.
13. Brant, H. (2011). Changes in Abundance, Diversity and Community Composition of Mosquitoes Based on Different Land Use in Sabah, Malaysia. Tesis de Magister en Ciencias. Colegio Imperial de Londres. Londres, Inglaterra.
14. Brown, S., A. Cao, P. Dobson, E. Hines, R. Akhurst, & P. East. (2006). Txp40, a Ubiquitous Insecticidal Toxin Protein from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(2): 1653-1662.
15. Bueno, R. & R. Jiménez. (2012). Implicaciones sanitarias del establecimiento y expansión en España del mosquito *Aedes albopictus*. *Revista Española de Salud Pública*. 86: 319-330.
16. Cagnolo, S. & W. Almirón. (2010). Capacity of the terrestrial entomopathogenic nematode *Steinernema rarum* (Rhabditida: Steinernematidae) to parasite *Culex apicinus* larvae (Diptera: Culicidae). *Revista de la Sociedad Entomológica de Argentina*. 69 (1-2): 141-145.
17. CFSPH – Center for Food Security and Public Health. (2010). Encefalomiелitis equina: del este, del oeste y venezolana. Universidad del Estado de Iowa. [Actualizado: abril 2008 – Revisado: 12 febrero, 2013]. Disponible a través de: [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/encefalomiелitis\\_equina.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/encefalomiелitis_equina.pdf)
18. Cerda, J., G. Valdivia, M. Valenzuela & J. Venegas. (2008). Cambio climático y enfermedades infecciosas. Un nuevo escenario epidemiológico. *Revista chilena de infectología*. 25 (6): 447-452.
19. Coimbra, T., C. Santos, A. Suzuki, S. Petrella, I. Bisordi, A. Nagamori, A. Marti, R. Santos, D. Fialho, S. Lavigne, M. Buzzar & I. Rocco. (2007). Mayaro virus: imported cases of human infection in São Paulo state, Brazil. *Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 49(4): 221-224.
20. Dadd, R. (1971). Size limitations on the infectibility of mosquito larvae by nematodes during filter-feeding. *Journal of Invertebrate Pathology*. 18: 246-251.

21. Darsie, R. (1988). A taxonomic separation of *Aedes albopictus* from mosquitoes in the greater antilles of the caribbean area (Diptera, Culicidae). *Mosquito Systematics*. 20(3): 357-369.
22. Darsie, R. & A. Samanidou. (1997). Keys for the identification of the mosquitoes of Greece. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 13(3): 247-254.
23. De la Hoz, F. (2000). Encefalitis equina Venezolana. *MVZ-Cordoba*. 5(1): 18-22.
24. Dieng, H., C. Mwandawiro, M. Boots, R. Morales, T. Satho, N. Tuno, Y. Tsuda & M. Takagi. (2002). Leaf litter decay process and the growth performance of *Aedes albopictus* larvae (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology*. 27(1): 31-38.
25. Dillman, A., J. Chaston, B. Adams, T. Ciche, H. Goodrich-Blair, S. Stock & P. Sternberg. (2012). An Entomopathogenic Nematode by Any Other Name. *Plos Pathogen*. 8(3): 1-4.
26. Divya, K. & M. Sankar. (2009). Entomopathogenic nematodes in pest management. *Indian Journal of Science and Technology*. 2(7): 53-60.
27. Doods, W. (2002). *Freshwater Ecology, Concepts and Environmental Applications*. Academic Press. San Diego.
28. Doucet, M. & A. Giayeito. (1994). Gama de huéspedes y especificidad en *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Heterorhabditidae: Nematoda). *Nematología mediterránea*. 22:171-178.
29. Eiman, M., M. Introini & C. Rispoll. (2012). Directrices para la prevención y control de *Aedes aegypti*. Ministerio de Salud de la Nación. Buenos Aires, Argentina. [Revisado: 13 de febrero, 2013]. Disponible a través de: <http://www.msal.gov.ar/dengue/index.php/>
30. Forattini, O. (1986). Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. *Revista de Saúde Pública*. 20 (3): 244-245.
31. García, F. (1994). Los Nematodos Entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhanditidae) presentes en Cataluña y su utilización para el Control Biológico de Insectos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.
32. García, E., A.de Jesús, L. Diéguez & N. Estévez. (2008). Vectores de interés sanitario en la Universidad Médica de Camagüey. Sus implicaciones epidemiológicas. *Archivo Médico de Camagüey*. 12 (1): 1-17.
33. García, A. (2011). Hongos entomopatógenos (mycota: deuteromycetes) aislados en el noroeste de México: impacto sobre la longevidad, fecundidad, fertilidad y tasas de cópula e

- inseminación en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México.
34. Gaugler, R. (2002). *Entomopathogenic nematology*. CAB international. Londres.
  35. Gerberg E. & R. Arnett. (1976). A pictorial key to the mosquito larvae of the Seychelles. *Mosquito Systematics*. 8(4): 343-346.
  36. González, M. (1995). Susceptibilidad de *Mocis latipes* (Gueneé) (Lepidoptera: Noctuidae), al nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Rhabditida: Heterorhabditidae). Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Colima. Colima, México.
  37. Hammer, O., D. Harper & P. Ryan. (2001). PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 1-9. Disponible en: <http://folk.uio.no/ohammer/past/>
  38. Harrison, B. & R. Rattanarithikul. (1973). Comparative Morphology of the Early Larval Instars of *Aedes aegypti* and *A. seatoi* in Thailand. *Mosquito systematics*. 5(4): 280-294.
  39. Hazir, S., H. Kaya, S. Stock & N. Keskün. (2004). Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for Biological Control of Soil Pests. *Turkish Journal of Biology*. 27: 181-202.
  40. Kesavaraju, B. & S. Juliano. (2004). Differential Behavioral Responses to Water-Borne Cues to Predation in Two Container-Dwelling Mosquitoes. *Annals of the Entomological Society of America*. 97(1): 194-201.
  41. Lara, R., T. Castro, G. Castro, J. Castro & A. Malpica. (2003). La importancia de los nematodos de vida libre. *ContactoS*. 48: 43-46.
  42. Lewis, E., J. Campbell, C. Griffin, H. Kaya & A. Peters. (2006). Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biological Control*. 38: 66-79.
  43. Lord, C. (2007). Modeling and biological control of mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 23(2): 252-264.
  44. Maharmart, S. (2008). Efficacy of entomopathogenic nematodes (nematoda: Rhabditida) against *Culex gelidus* (diptera: Culicidae) larvae. Tesis de Magister. Facultad de Estudios Graduados. Universidad Mahidol. Bangkok, Tailandia.
  45. Marquetti M., Y. Saint, C. Fuster & L. Somarriba. (2012). The first report of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* in Haiti. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 107(2): 279-281.

46. Meldal, B., N. Debenhamb, P. De Ley, I. Tandingan, J. VanXeteren, A. Vierstraete, W. Bert, G. Borgonie, T. Moens, P. Tyler, M. Austen, M. Blaxter, A. Rogers & P. Lamshead. (2007). An improved molecular phylogeny of the Nematoda with special emphasis on marine taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 42: 622–636.
47. Mesa, A., G. Alvarado, J. Maradiaga & R. Ramos. (2013). Primer hallazgo de *Aedes albopictus* en el área metropolitana de Honduras. *MEDISAN*. 17(8): 3001-3009.
48. Molta, N. & W. Hominick. (1989). Dose and time response assessments of *Heterorhabditisheliothidis* and *Steinernema feltidae* (Nematode: Rhabtidae) against *Aedes aegypti* larvae. *Entomophaga*. 34 (4): 484-493.
49. MPPS – Ministerio del Poder Popular para la Salud. (2014a). Resumen de la Situación Epidemiológica Nacional. Semana Epidemiológica N°05. *Boletín epidemiológico*. 68(5): 1-27.
50. MPPS – Ministerio del Poder Popular para la Salud. (2014b). Confirmado un caso importado de Chikungunya en Venezuela. [Revisado: 26 Junio, 2014]. Disponible a través de: <http://www.mpps.gob.ve/>
51. MPPS – Ministerio del Poder Popular para la Salud. (2014c). Resumen de la Situación Epidemiológica Nacional. Semana Epidemiológica N°40. *Boletín epidemiológico*. 68(40): 1-28.
52. MPPS – Ministerio del Poder Popular para la Salud. (2014d). Eliminados este fin de semana 218.447 criaderos de zancudos en el país (13/10). [Revisado: 25 Octubre, 2014]. Disponible a través de: <http://www.mpps.gob.ve/>
53. Muñoz, M. & C. Navarro. (2012). Virus Mayaro: un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. *Biomédica*. 32: 286-302.
54. Navarro J., A. Zorrilla & N. Moncada. (2009). Primer registro de *Aedes albopictus* (Skuse) en Venezuela. Importancia como vector de Dengue y acciones a desarrollar. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 49(1): 161-166.
55. Nguyen, K. & G. Smart. (1990). *Heterorhabditis* spp.: Nematode parasites of insects. *Nematology circular*. 173:1-4.
56. Nguyen, K., D. Shapiro-Ilan, R. Stuart, C. McCoy, R. James & B. Adams. (2004). *Heterorhabditis mexicana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Tamaulipas, Mexico, and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis* spp. *Nematology*. 6(2): 231-244.

57. Nicholls, C. (2008). *Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico*. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín.
58. O'Donnell, D. & P. Armbruster. (2007). Comparison of Larval Foraging Behavior of *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 44(6): 984-989.
59. Oguzoglu, I. & N. Ozer. (2007). Bioassays of Entomopathogen Nematode *Steinernema feltiae* All Type (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* Tur-H2 (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Hacettepe Journal of Biology & Chemistry*. 35 (1): 39-44.
60. OPS – Organización Panamericana de la Salud. (2011). *Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas*. Biblioteca Sede OPS. Washington.
61. Paily, K., K. Chandhiran, P. Vanamail, N. Pradeep & P. Jambulingam. (2013). Efficacy of a mermithid nematode *Romanomermis iyengari* (Welch) (Nematoda: Mermithidae) in controlling tree hole-breeding mosquito *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in a rubber plantation area of Kerala, India. *Parasitology Research*. 112:1299–1304.
62. Pérez, E. & D. Molina. (2009). Resistencia focal a insecticidas organosintéticos en *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Díptera: Culicidae) de diferentes municipios del estado Aragua, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 49(1): 143-150.
63. Perveen, F. (2011). *Insecticides – Advances in Integrated Pest Management*. InTech. Rijeka.
64. Platzer, E. (2007). Mermithid nematodes. *The American Mosquito Control Association*. 23(2): 58-64.
65. Poinar, G. & H. Kaul. (1982). Parasitism of the Mosquito *Culex pipiens* by the Nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 39: 382-387.
66. Poopathi, S. & B. Tyagi. (2006). The Challenge of Mosquito Control Strategies: from Primordial to Molecular Approaches. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 1(2): 51-65.
67. Porta, L. (2012). Fiebre Chikungunya Amenaza para la Región de las Américas. *Salud Militar*. 31(1): 25-33.
68. Pretty, J. (2005). *The Pesticide Detox, Towards a More Sustainable Agriculture*. Earthscan. Londres.

69. Qiu, L., J. Zhao, Z. Wu, Z. Lv & Y. Pang. (2011). *Steinernema pui* sp. n. (Rhabditida, Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Yunnan, China. *Zootaxa*. 2767: 1-13.
70. Quinto C., H. Frontado, M. Ledezma, G. Polanco & J. Naranjo. (2013). *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) en los estados Monagas y Guárico, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 53(1): 65-67.
71. Ramírez, R., Y. Estrada & H. Guzmás. (2012). Primer registro para el estado Aragua de *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894 (Diptera: Culicidae). *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 52(2): 307-309.
72. Rodríguez, J., I. García, Z. Meléndez, I. García, J. Eladio & R. Pérez. (2005). Efecto patogénico de 3 nematodos parásitos en larvas de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio, en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 57 (3):1-6.
73. Rosales, L., M. Rodríguez, R. Enrique, L. Puente & J. García. (2009). Cría masivade nematodos entomopatógenos para el control de insectos plagas. *INIA divulga*. 12: 19-22.
74. Rossi G., N. Pascual & F. Krsticevic. (1999). First record of *Aedes albopictus* (Skuse) from Argentina. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 15(3):422.
75. Rossi G. & M. Martínez. (2003). Mosquitos (Diptera:Culicidae) del Uruguay. *Entomología y Vectores*. 10(4): 469-478.
76. Rúa-Urbe, G., C. Suárez-Acosta & R. Rojo. (2012). Implicaciones epidemiológicas de *Aedes albopictus* (Skuse) en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*. 30(3): 328-337.
77. Rueda, L. (2004). Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission. *Zootaxa*. 589: 1-60.
78. Salvatella, R. (1996). *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Diptera,Culicidae) y su papel como vectores en las Américas. La situación de Uruguay. *Revista Médica de Uruguay*. 12: 28-36.
79. San-Blas, E., B. Pembroke & S. Gowen. (2012). Scavenging and infection of different hosts by *Steinernema carpocapsae*. *Nematropica* 42:123-130.
80. San-Blas, E, D. Pirela, D. García & E. Portillo. (2014). Ammonia concentration at emergence and its effects on the recovery of different species of entomopathogenic nematodes. *Experimental Parasitology*. 144: 1-5.
81. Santamarina, A. & R. Pérez. (1998). Efecto patogénico del nematodo parásito *Romanomermis iyengari* (Nematoda: Mermithidae) en larvas del mosquito *Aedes aegypti*

- (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio en el Estado de Oaxaca, México. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 50 (1): 8-11.
82. Santamarina, A., R. Pérez & S. Honorio. (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 (5): 299-304.
83. Scholte, E., W. Takken & B. Knols. (2007). Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*. 102: 151-158.
84. Seijas, I. (2004). Estudio de la nematofauna edáfica asociada a cultivos frutícolas de manzano (*Malus domestica* borkh.) y a biotopos forestales de roble (*Quercus robur* l.) En Galicia como base previa al control biológico de plagas de babosas con nematodos zooparásitos. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Compostela. Santiago de Compostela, España.
85. Selvan, S., J. Campbell & R. Gaugler. (1993). Density-Dependent Effects on Entomopathogenic Nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) within an Insect Host. *Journal of Invertebrate Pathology*. 62(3): 278–284.
86. Sepúlveda, P., J. López & A. Soto. (2008). Efecto de dos nematodos entomopatógenos sobre *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Dryophthoridae). *Revista Colombiana de Entomología*. 34 (1): 62-67.
87. Sivagnaname, N., D. Dominic & T. Mariappan. (2005). Utility of expanded polystyrene (EPS) beads in the control of vector-borne diseases. *Indian Journal of Medical Research*. 122: 291-296.
88. Sivanathan, M. (2006). The ecology and biology of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) and the resistance status of *Aedes albopictus* (field strain) against organophosphates in Penang, Malaysia. Tesis de Maestro en Ciencias.
89. Smart, G. (1995). Entomopathogenic Nematodes for the Biological Control of Insects. *Journal of Nematology*. 27(4S):529-534.
90. Sprenger, D. & T. Wuithiranyagool. (1986) The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2(2): 217–219.

91. Stock, S., C. Griffin & R. Chaerani. (2004). Morphological and molecular characterisation of *Steinernema hermaphroditum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Indonesia, and its phylogenetic relationships with other members of the genus. *Nematology*. 6(3): 401-412.
92. Swaroop, A., A. Jain, M. Kumhar, N. Parihar & S. Jain. (2007). Chikungunya Fever. *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine*. 8(2): 164-168.
93. Ulvedal, C. (2012). Infectividad de *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda:Heterorhabditidae) en larvas de *Aedes aegypti* (L.) y *Culex quinquefasciatus* Say en condiciones de laboratorio. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
94. Vainio, J. & F. Cutts. (1998). *Yellow fever*. World Health Organization. Genova.
95. Valdés, V., M. Marquetti, K. Pérez, R. González & L. Sánchez. (2009). Distribución espacial de los sitios de cría de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) en Boyeros, ciudad de la Habana, Cuba. *Revista Biomédica*. 20:72-80.
96. Vargas, D., J. Jaime & V. Vera. (2009). Aspectos generales del virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV). *Orinoquia*. 13(1): 59-67.
97. Vélez, I., M. Quiñones, M. Suarez, V. Olano, L. Murcia, E. Correa, C. Arévalo, L. Pérez, H. Brochero & A. Morales. (1998). Presencia de *Aedes albopictus* en Leticia, Amazonas, Colombia. *Biomédica*. 18(3):192-8.
98. Vezzani, D. & A. Carbajo. (2008). *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: current knowledge and future directions. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*. 103(1): 66-74.
99. Yee, D., B. Kesavaraju, & S. Juliano. (2004a). Interspecific Differences in Feeding Behavior and Survival Under Food-Limited Conditions for Larval *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 97(4): 720–728.
100. Yee, D., B. Kesavaraju, & S. Juliano. (2004b). Larval feeding behavior of three co-occurring species of container mosquitoes. *Journal of Vector Ecology*. 29(2): 315–322.
101. Zohdy, N., M. Shamseldean, E. Abd-El-Samie & H. Hamama. (2013). Efficacy of the Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes for Controlling the Mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Journal of Mosquito Research*. 3(5): 33-44.

## **ANEXOS**

**Anexo A. Tabla de resultados arrojados en el test de ANOVA de una vía, para cada uno de los grupos evaluados.**

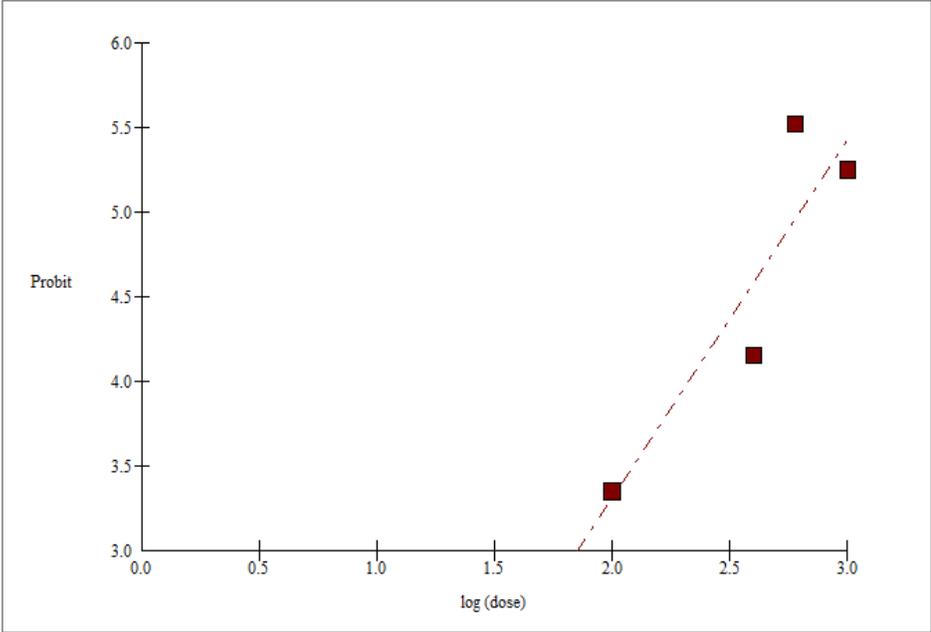
<b>Grupo</b>	<b>Factor</b>	<b>Sum of sqrs</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Mean square</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Larvas de 2do estadio en cápsulas</b>	Concentraciones:	23984,1	5	4796,82	32,25	6,70E-10
	Réplicas:	3570	24	148,75		
	Total:	27554,1	29			
	omega2:	0,8389				
<b>Larvas de 3er estadio en cápsulas</b>	Concentraciones:	43666,6	5	8733,31	47,85	1,05E-11
	Réplicas:	4380	24	182,5		
	Total:	48046,6	29			
	omega2:	0,8865				
<b>Larvas de 2do estadio en frascos</b>	Concentraciones:	376,652	5	75,3304	8,218	0,0001228
	Réplicas:	220	24	9,16667		
	Total:	596,652	29			
	omega2:	0,5461				
<b>Larvas de 3er estadio en frascos</b>	Concentraciones:	2546,62	5	509,323	9,625	3,86E-05
	Réplicas:	1270	24	52,9167		
	Total:	3816,62	29			
	omega2:	0,5897				

**Anexo B. Tabla de resultados arrojados en el test de ANOVA de dos vías, para comparaciones entre grupos evaluados.**

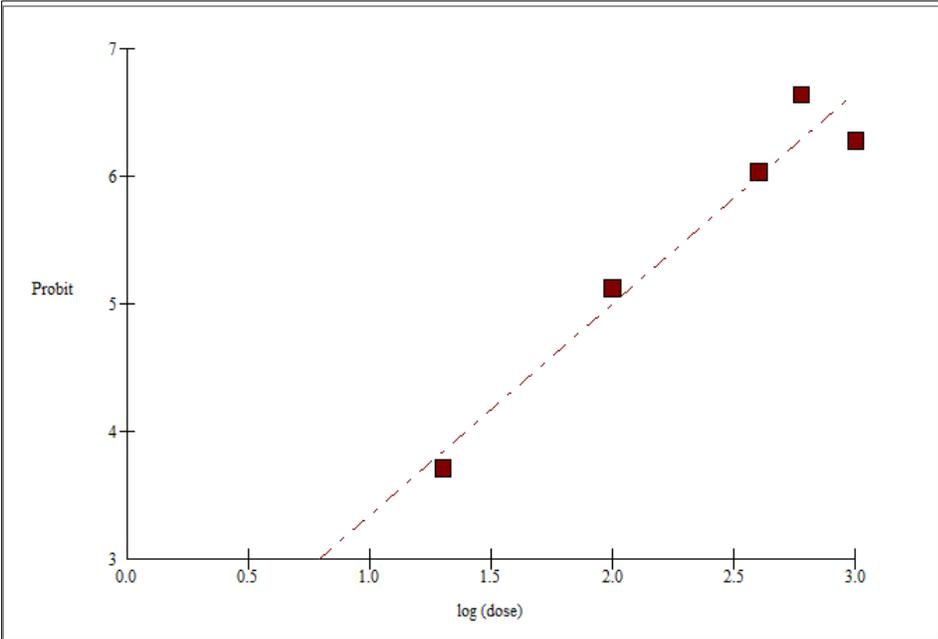
<b>Grupos comparados</b>	<b>Factor</b>	<b>Sum of sqrs</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Mean square</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Larvas de 2do y 3er estadio (cápsulas)</b>	Estadios:	13053,8	1	13053,8	78,82	1,07E-11
	Concentraciones:	60397,1	5	12079,4	72,93	3,01E-21
	Interacción:	7253,75	5	1450,75	8,759	5,86E-06
	Dentro:	7950	48	165,625		
	Total:	88654,6	59			
<b>Larvas de 2do y 3er estadio (frascos)</b>	Estadios:	326,667	1	326,667	10,52	0,002149
	Concentraciones:	2425	5	485	15,62	4,12E-09
	Interacción:	498,333	5	99,6667	3,211	0,014
	Dentro:	1490	48	31,0417		
	Total:	4740	59			
<b>Cápsulas y frascos (2do estadio)</b>	Profundidad:	7370,42	1	7370,42	93,35	7,72E-13
	Concentraciones:	14963,8	5	2992,75	37,9	1,49E-15
	Interacción:	9397,08	5	1879,42	23,8	5,93E-12
	Dentro:	3790	48	78,9583		
	Total:	35521,3	59			
<b>Cápsulas y frascos (3er estadio)</b>	Profundidad:	33135	1	33135	281,5	1,03E-21
	Concentraciones:	32043,3	5	6408,67	54,45	1,25E-18
	Interacción:	14170	5	2834	24,08	4,90E-12
	Dentro:	5650	48	117,708		
	Total:	84998,3	59			

**Anexo C. Valores promedio (Unidades Probit) de las concentraciones letales de *H. amazonensis* para el 50 % de las larvas de *Ae. albopictus* (CL<sub>50</sub>) calculados para los grupos evaluados en cápsulas. A: 2do estadio; B: 3er estadio.**

**A**



$y= a+bx$   $a= -1,07603032085189$ ,  $b= 2,17710927731461$

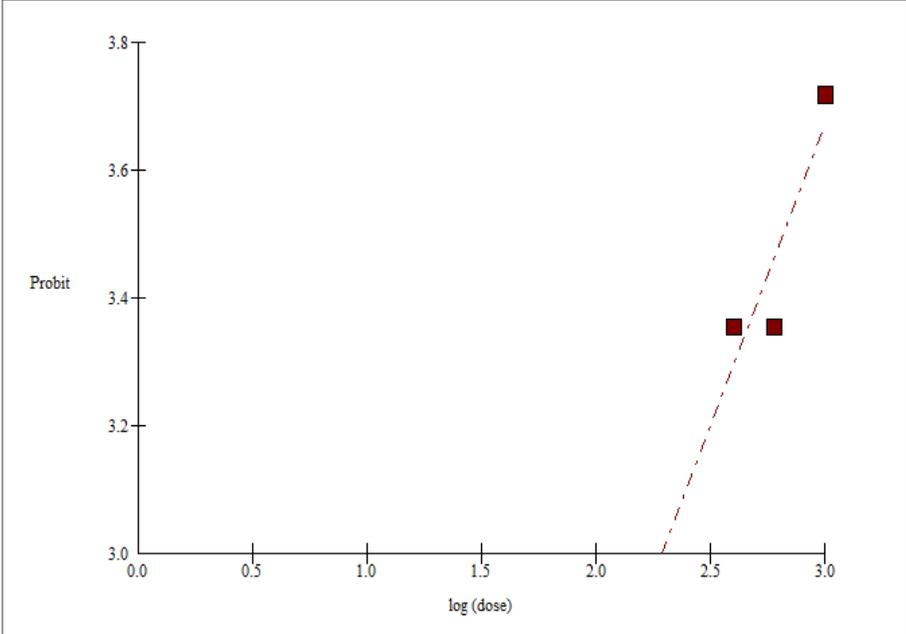


**B**

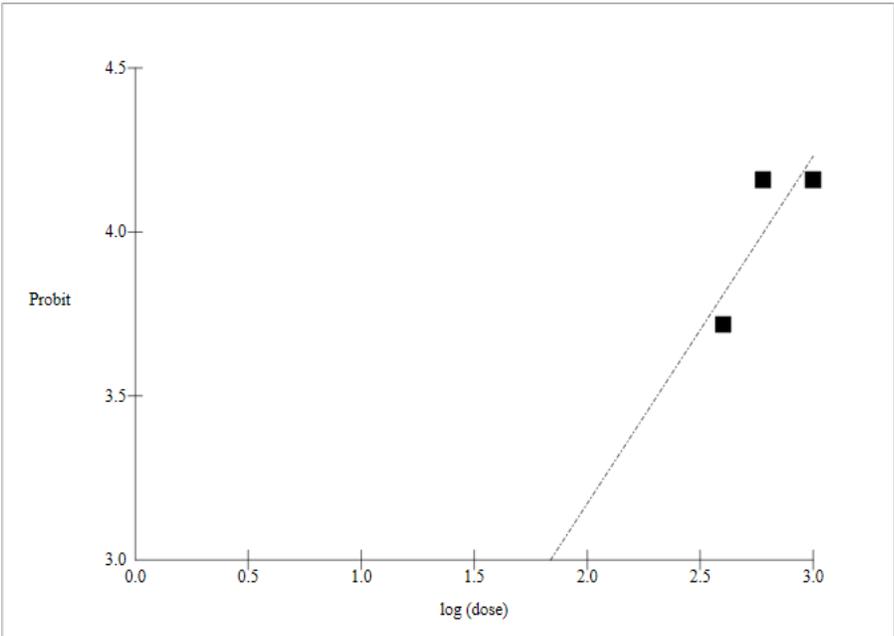
$y= a+bx$   $a= 1,72274460040962$ ,  $b= 1,6485513582607$

**Anexo D. Valores promedio (Unidades Probit) de las concentraciones letales *H. amazonensis* para el 50 % de las larvas de *Ae. albopictus* (CL<sub>50</sub>) calculados para los grupos evaluados en frascos. A: 2do estadio; B: 3er estadio.**

**A**



$y = a + bx$   $a = 0,699806333462319$ ,  $b = 0,994971575500021$

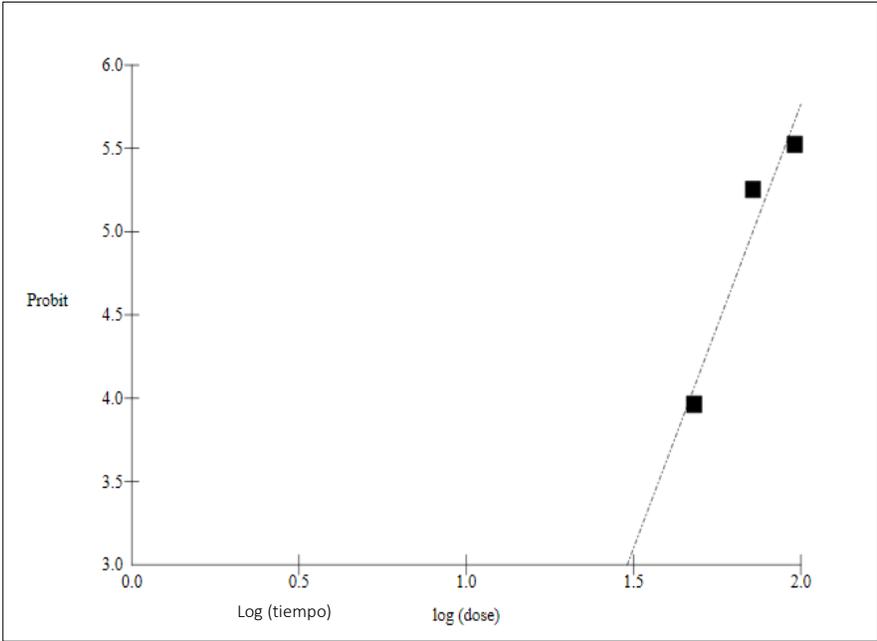


**B**

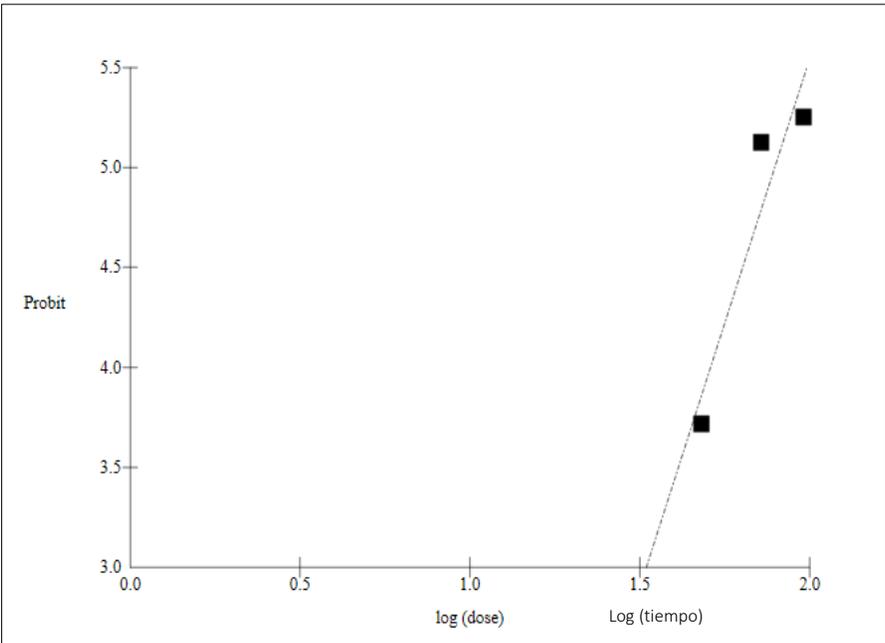
$y = a + bx$   $a = 1,27498698298086$ ,  $b = 0,982703507743152$

**Anexo E. Valores promedio (Unidades Probit) de los tiempos letales para el 50 % de las larvas de 2do estadio de *Ae. albopictus* (TL<sub>50</sub>) en cápsulas, a diferentes concentraciones de *Heterorhabditis* sp . A: 600:1; B: 1000:1.**

**A**



$y= a+bx$   $a= -4,69664855428231$ ,  $b= 5,23242627618132$

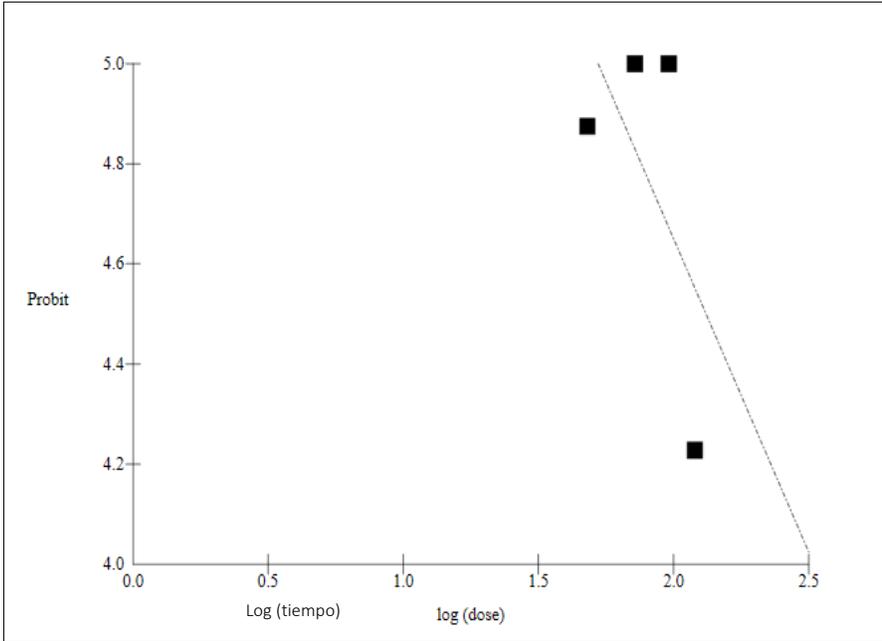


**B**

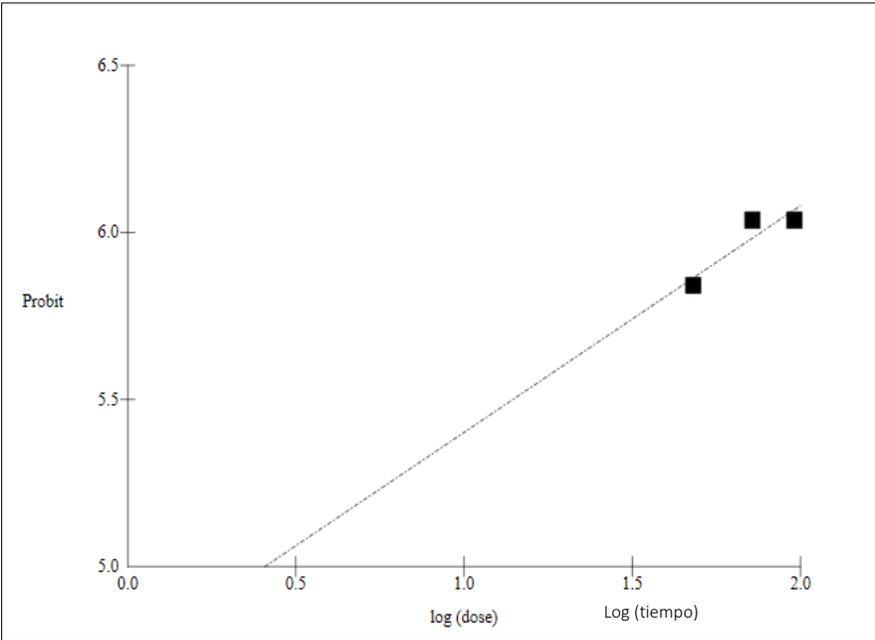
$y= a+bx$   $a= -4,44683517233221$ ,  $b= 4,98779472397084$

**Anexo F. Valores promedio (Unidades Probit) de los tiempos letales para el 50 % de las larvas de 3er estadio de *Ae. albopictus* (TL<sub>50</sub>) en cápsulas, a diferentes concentraciones de *H. amazonensis*. A: 100:1; B: 400:1, C: 600:1, D: 1000:1.**

**A**



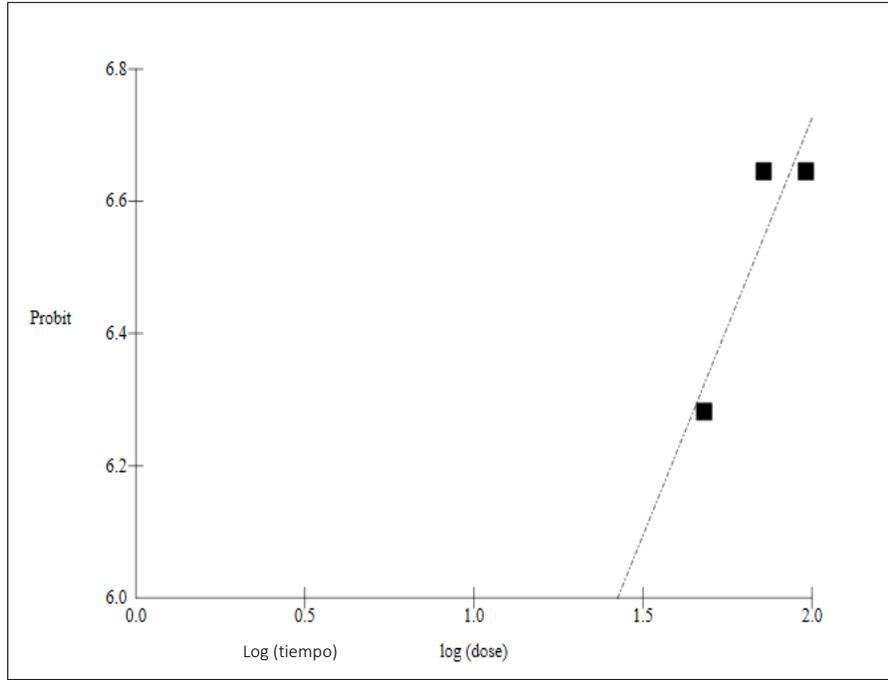
$y = a + bx$   $a = 7,8800260511826$ ,  $b = -1,66081194372288$



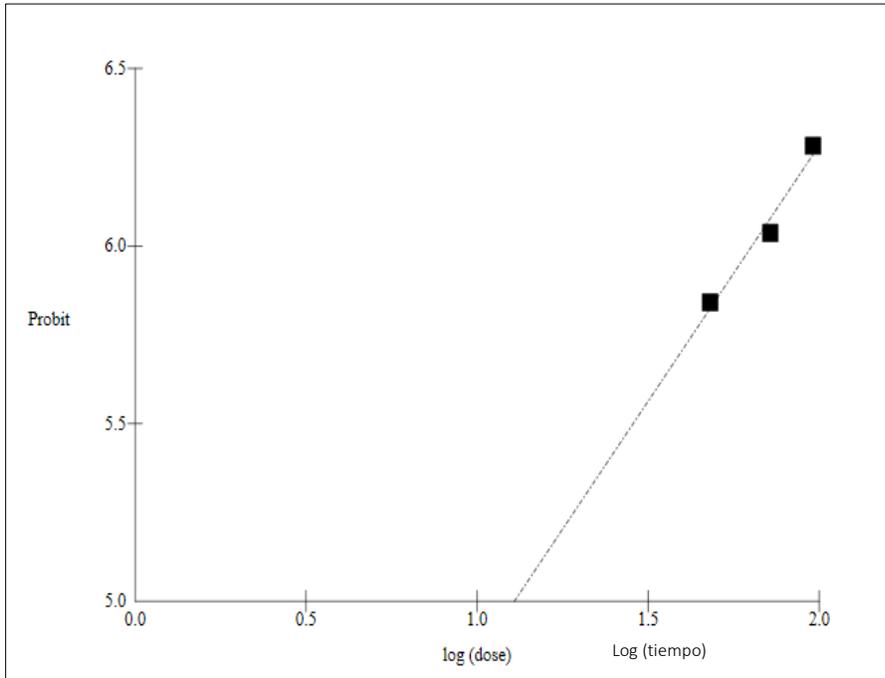
**B**

$y = a + bx$   $a = 4,70407646827737$ ,  $b = 0,688388168719966$

C



$y = a + bx$   $a = 4,08558712288783$  ,  $b = 1,32352582994087$

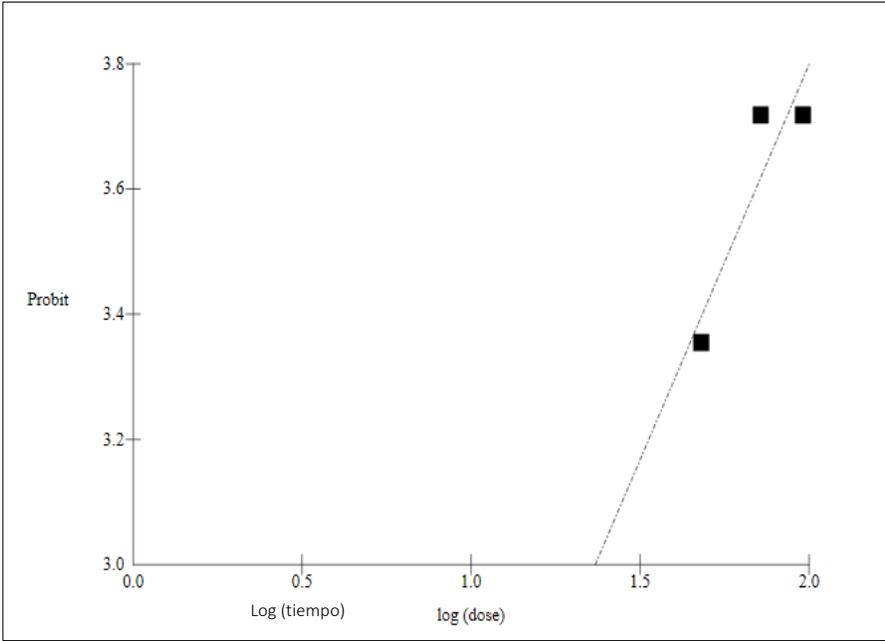


D

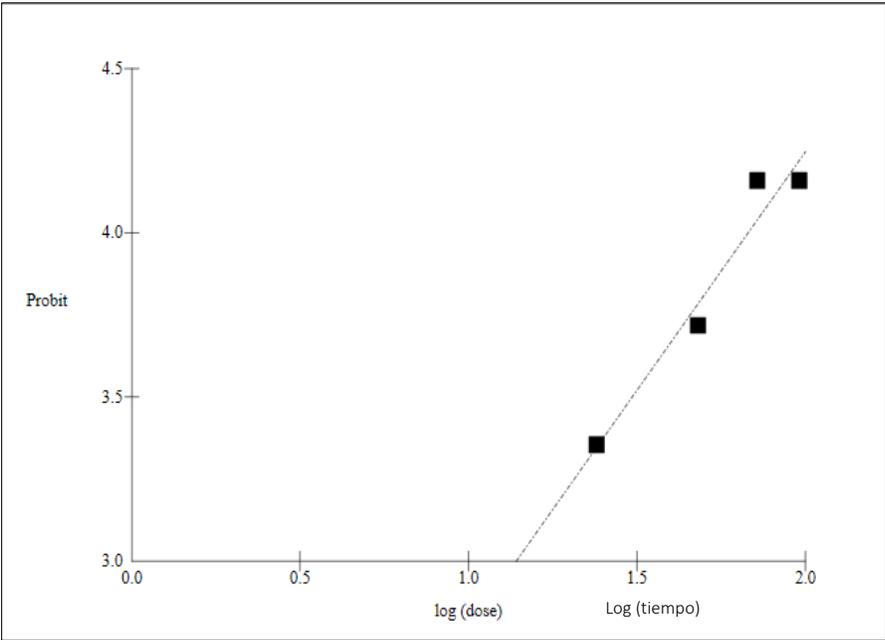
$y = a + bx$   $a = 3,45009892862477$  ,  $b = 1,41400946454674$

**Anexo G. Valores promedio (Unidades Probit) de los tiempos letales para el 50 % de las larvas estadio de *Ae. albopictus* (TL<sub>50</sub>) en frascos, bajo concentración de 1000 IJs de *H. amazonensis*, por larva. A: 2do estadio; B: 3er estadio.**

**A**



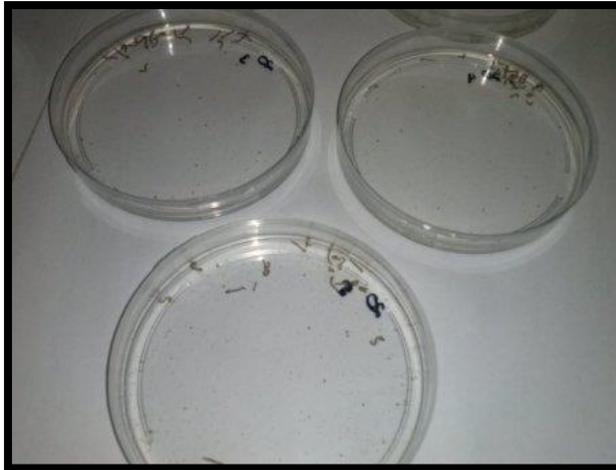
$y = a + bx$   $a = 1,40500548106$ ,  $b = 1,19389502930843$



**B**

$y = a + bx$   $a = 1,35770445165305$ ,  $b = 1,44528104947553$

**Anexo H. Infecciones de *Aedes albopictus* con *Heterorhabditis amazonensis*.**



**Bioensayos en cápsulas de Petri**

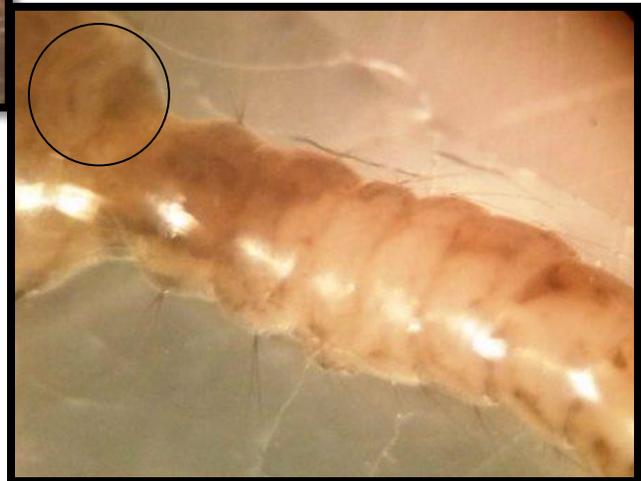


**Larva infectada con *H. amazonensis*  
(Cambio de coloración)**



**Larva infectada con *H. amazonensis*  
(Cambio de coloración). 20x**

**Larva infectada con *H. amazonensis*  
(Cambio de coloración). 40x**



**Anexo I. Cría de *Aedes albopictus***



**Bandeja con larvas y pupas**



**Acure para alimentación de hembras**



**Jaula para los adultos**



**Fuente de alimentación de machos y recipiente para oviposición**



**Almacenamiento de huevos**



**Huevos de *Ae. albopictus***



**Tiras de huevos puestas para  
eclosión**

**Adulto emergiendo**



**Anexo J. Cría de nematodos entomopatógenos.**



**Larvas de *Galleria mellonella* infectadas por *H. amazonensis***

**Trampa de White**



**Equipo de conteo de nematodos entomopatógenos**