



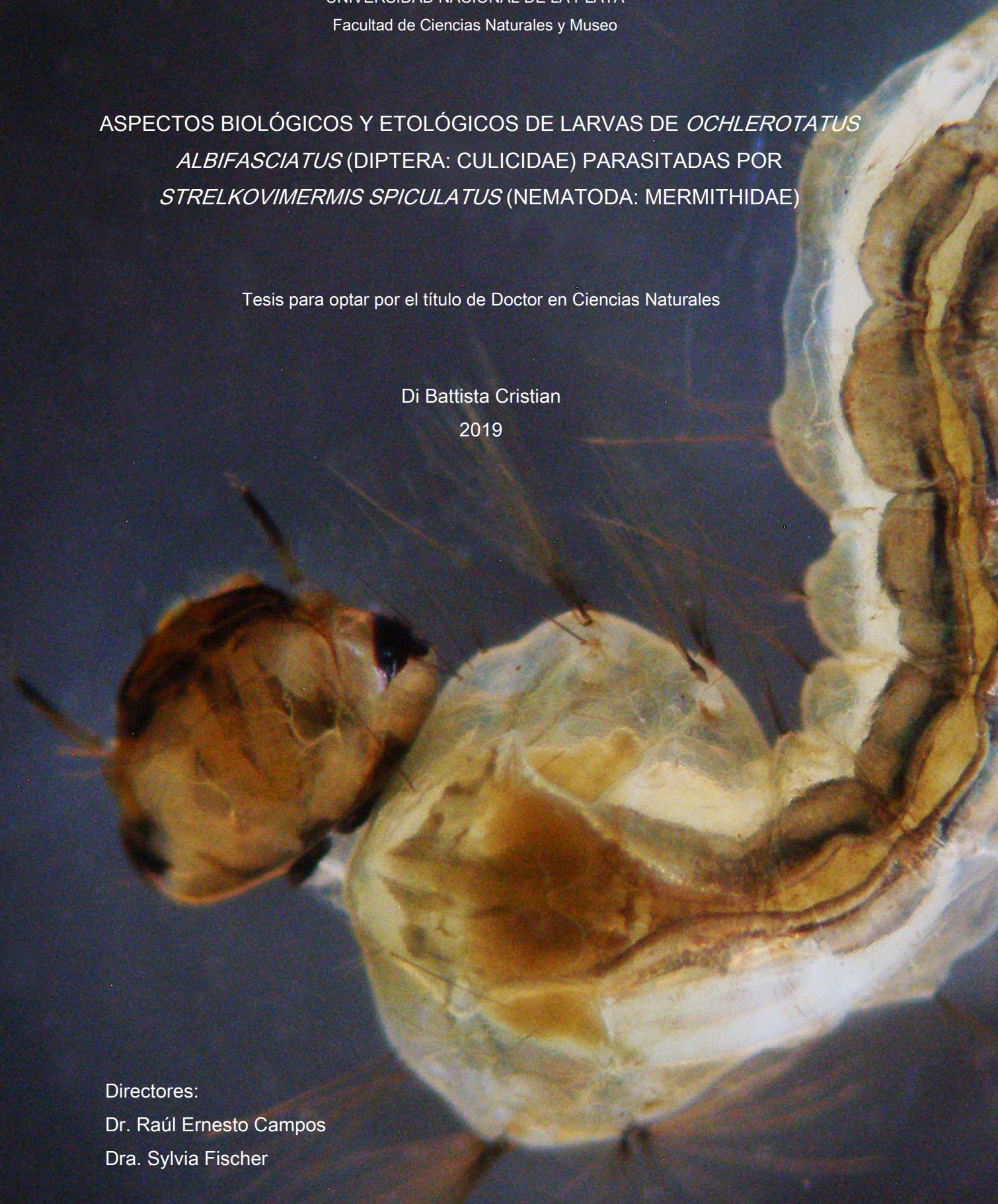
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Facultad de Ciencias Naturales y Museo

ASPECTOS BIOLÓGICOS Y ETOLÓGICOS DE LARVAS DE *OCHLEROTATUS*
ALBIFASCIATUS (DIPTERA: CULICIDAE) PARASITADAS POR
STRELKOVIMERMIS SPICULATUS (NEMATODA: MERMITHIDAE)

Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Naturales

Di Battista Cristian
2019

Directores:
Dr. Raúl Ernesto Campos
Dra. Sylvia Fischer



Agradecimientos

A mis directores, Raúl Campos y Sylvia Fischer por hacer posible este trabajo, por su generosidad y compromiso en todo momento.

A mi familia por el incentivo y constante apoyo durante mi carrera.

A mis amigos, los que están cerca y los que no, gracias por estar siempre presentes.

A los compañeros del ILPLA, por hacer agradable la jornada laboral.

A las personas que hicieron y hacen posible el funcionamiento de las siguientes instituciones:

Instituto de Limnología Dr. Raúl Ringuelet

Facultad de Ciencias Naturales y Museo.

Universidad Nacional de La Plata.

Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

A las Políticas de Ciencia y Tecnología del periodo 2003–2015, que coincidieron con los inicios de mi desarrollo académico y favorecieron de forma directa o indirecta, la realización de mis pasantías, becas y cursos.

A la educación pública, gratuita, laica, diversa, inclusiva y de calidad.

INDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN GENERAL	15
Inicio de los estudios sobre mosquitos	15
Importancia sanitaria de la familia Culicidae.....	17
Importancia sanitaria de <i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	21
Biología y ecología de Culicidae.....	22
Biología y ecología de <i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	23
Conceptos de control biológico.....	24
Importancia de los nematodos Mermithidae como agentes de control de mosquitos	27
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
HIPÓTESIS GENERAL	29
HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	29
MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	31
Limitaciones relacionadas con el muestreo y la cría de <i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	31
Descripción y caracterización de los sitios de captura de <i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	32
Captura de <i>Ochlerotatus albifasciatus</i> adultos –obtención de huevos– y almacenaje	33
Captura de larvas de <i>Ochlerotatus albifasciatus</i> parasitadas y obtención de <i>Strelkovimermis spiculatus</i>	35
Inicio y mantenimiento de la colonia de <i>Aedes aegypti</i>	37
Inicio y mantenimiento de la colonia de <i>Strelkovimermis spiculatus</i>	38
CAPÍTULO I	
Susceptibilidad al parasitismo de <i>Strelkovimermis spiculatus</i> en larvas de <i>Aedes albifasciatus</i> provenientes de huevos con diferentes tiempos de dormancia.....	40
I. Introducción.....	41
I. Materiales y métodos	42

Diseño experimental y procedimientos	42
Análisis de los datos	44
I. Resultados	47
Prevalencia e intensidad del parasitismo.....	47
Retención de nematodos.....	48
Melanización de nematodos	49
Mortalidad de <i>Ochlerotatus albifasciatus</i> parasitados	50
Supervivencia de <i>Ochlerotatus albifasciatus</i> no parasitados.....	51
I. Discusión.....	53

CAPÍTULO II

Evaluación del parasitismo producido por <i>Strelkovimermis spiculatus</i> en larvas de <i>Ochlerotatus albifasciatus</i> variando la relación parásito/hospedador y la altura de la columna de agua	57
II. Introducción	58
II. Materiales y Métodos	59
Diseño experimental y procedimientos	59
Análisis de los datos	60
II. Resultados	62
Experimento 1: Infecciones variando la altura de la columna de agua.....	62
Prevalencia e intensidad del parasitismo.....	62
Postparásitos de <i>Strelkovimermis spiculatus</i> emergidos.....	62
Mortalidad de <i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	63
Experimento 2: Infecciones variando la relación parásito-hospedador en función de la altura de la columna de agua	64
Prevalencia e intensidad del parasitismo.....	64
Postparásitos de <i>Strelkovimermis spiculatus</i> emergidos en cada tratamiento	65
Mortalidad de <i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	65
II. Discusión	67

CAPÍTULO III

Alteración del comportamiento en larvas de <i>Ochlerotatus albifasciatus</i> parasitadas por <i>Strelkovimermis spiculatus</i> , provenientes de huevos con diferentes periodos de dormancia	68
III. Introducción.....	69

III. Materiales y métodos	73
Diseño experimental y procedimientos	73
Registro de los comportamientos	75
Análisis de los datos	77
III. Resultados	78
Comportamiento general de <i>Ochlerotatus albifasciatus</i> durante el ensayo.....	78
Análisis de correlaciones entre los comportamientos.....	82
III. Discusión	84
DISCUSIÓN GENERAL, PROYECCIONES FUTURAS y CONCLUSIONES.....	87
Anexo	91
Referencias bibliográficas	96

RESUMEN

ASPECTOS BIOLÓGICOS Y ETOLÓGICOS DE LARVAS DE *OCHLEROTATUS ALBIFASCIATUS* (DIPTERA: CULICIDAE) PARASITADAS POR *STRELKOVIMERMIS SPICULATUS* (NEMATODA: MERMITHIDAE)

Ochlerotatus albifasciatus Macquart 1838, es el mosquito de importancia sanitaria de mayor distribución en Argentina, registrado en todas las provincias a excepción de San Juan y San Luis. Presenta un agresivo comportamiento de alimentación, atacando a mamíferos, principalmente a equinos, al ganado vacuno y al hombre, y sus poblaciones experimentan explosiones demográficas que lo convierten en un vector de relevancia en brotes epizooticos o epidémicos. Entre las enfermedades relacionadas con esta especie se encuentran aquellas producidas por los virus Cache Valley, Laguna Larga, y Encefalitis Equina del Oeste, esta última responsable de numerosas epizootias ocurridas en la zona templada de Argentina.

Los estados inmaduros de *O. albifasciatus* se desarrollan en charcos temporales o efímeros y presentan como principal enemigo natural al nematodo *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino 1986, el cual produce infecciones que pueden alcanzar el 100 por ciento de mortalidad en algunas poblaciones de larvas. La alta especificidad y los altos niveles de parasitismo, hacen que este parásito haya sido propuesto como candidato para el control biológico de culícidos.

El objetivo general de esta tesis fue contribuir al conocimiento de la interacción parásito-hospedador que se establece entre el nematodo *S. spiculatus* y su hospedador natural el mosquito de inundación *O. albifasciatus*.

Se realizaron tres experimentos en condiciones de laboratorio utilizando larvas de *O. albifasciatus* provenientes de huevos obtenidos de hembras recolectadas en un ambiente natural. Las formas infectantes del nematodo se obtuvieron de una colonia iniciada con parásitos provenientes de una infección natural de *O. albifasciatus*. Los muestreos se realizaron en los alrededores de la ciudad de La Plata y los experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones controladas de luz y temperatura en las salas de bioensayos del Instituto de Limnología Dr. Raúl Ringuelet, UNLP – CONICET.

El primer experimento tiene como objetivo evaluar el parasitismo producido por *S. spiculatus* en larvas de *O. albifasciatus* provenientes de huevos de diferentes periodos de dormancia (entre 2 y 10 meses). La hipótesis relacionada con este objetivo fue que los tiempos largos de dormancia de los huevos, inducen a las larvas provenientes de ellos, a ser más susceptibles al parasitismo producido por *S. spiculatus*.

La proporción de *O. albifasciatus* parasitados del primer experimento varió significativamente entre 0,20 y 0,47, pero sin evidenciar un cambio unidireccional con el incremento del tiempo de dormancia de los huevos. La cantidad de nematodos melanizados encontrados en el interior de las larvas muertas, no estuvieron relacionados con el aumento del tiempo de dormancia de los huevos, ni con la intensidad del parasitismo.

Por otro lado, la mortalidad por estadio en los individuos infectados fue mayor en el cuarto estadio de desarrollo y menor en el segundo y en el estado de pupa, en todos los tratamientos. Durante este experimento la supervivencia de las larvas fue baja, a excepción de aquellas provenientes de huevos de cuatro meses de dormancia.

El segundo experimento tiene como objetivo evaluar la prevalencia e intensidad del parasitismo de *S. spiculatus* en *O. albifasciatus* en columnas de agua de cinco, diez, quince y veinte centímetros de altura, utilizando una relaciones parásito-hospedador fijas y variables. La hipótesis relacionada a este experimento fue que la prevalencia e intensidad del parasitismo aumenta con la disminución de la altura de la columna de agua y con el aumento de la relación parásito-hospedador.

La proporción de larvas parasitadas en las infecciones con relación parásito-hospedador fija, varió entre 0,15 a 0,55, sin presentar diferencias significativas entre las diferentes alturas de las columnas de agua. La cantidad de nematodos encontrados por hospedador varió entre uno y cinco y no se relacionó con la altura de la columna de agua. El análisis de la proporción de postparasitos emergidos del total de parásitos en cada hospedador no mostró diferencias entre los tratamientos.

La proporción de larvas parasitadas en las infecciones con diferente relación parásito-hospedador, varió entre 0,55 y 0,85, sin presentar diferencias significativas en relación a las relaciones parásito-hospedador utilizadas. La intensidad del parasitismo no difirió significativamente entre los diferentes

tratamientos. El rango de nematodos por larva observado en el experimento fue de uno a nueve y el promedio varió entre 2,27 en el tratamiento de relación 30:1, y 4,15 en el tratamiento de relación 15:1. La proporción de postparásitos emergidos del total de nematodos que parasitaron cada larva de *O. albifasciatus*, no difirió entre los tratamientos y presentó valores entre 0,83 y 1.

En el tercer experimento se plantearon dos objetivos, el primero fue evaluar si el parasitismo producido por *S. spiculatus* altera el comportamiento de las larvas de *O. albifasciatus*. La hipótesis planteada en relación a este objetivo fue que existe una disminución de la actividad en general del comportamiento de las larvas parasitadas comparándolas con el de aquellas no parasitadas. El segundo objetivo fue determinar si la variación del tiempo de dormancia de los huevos, tiene algún efecto sobre el comportamiento de las larvas provenientes de los mismos, estén estas parasitadas o no por el nematodo. La hipótesis planteada en relación a este objetivo es que el aumento del tiempo de dormancia, incrementa las diferencias observadas en el comportamiento entre larvas parasitadas y no parasitadas.

En este estudio, que fue el primero en registrar el comportamiento de larvas de *O. albifasciatus* en condiciones de laboratorio, se observó una enorme variabilidad del comportamiento entre larvas expuestas a las mismas condiciones. Los individuos permanecieron la mayor parte del tiempo, quietos, filtrando en la superficie, nadando mediante culebreo o moviéndose y alimentándose cerca de la superficie. Solo dos comportamientos de los ocho registrados, el culebreo y la alimentación en la pared, variaron en función del tiempo de dormancia de los huevos y ninguno lo hizo en relación al parasitismo producido por *S. spiculatus*.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, existe una gran variabilidad en el parasitismo en larvas provenientes de huevos de distintos tiempo de dormancia pero no se puede atribuir esa variación unívocamente al tiempo transcurrido. Es decir que las larvas provenientes de huevos de tiempos prolongados de dormancia no necesariamente serían parasitadas en mayor proporción o con mayor intensidad que aquellas de tiempos relativamente más cortos. La baja proporción de larvas parasitadas en la mayoría de las infecciones realizadas, comparada con otros trabajos, podría estar relacionada con la metodología empleada al momento de la infección y con la utilización del hospedador natural del nematodo, *O. albifasciatus*.

La variabilidad observada en los parámetros evaluados del presente estudio ayuda a comprender la interacción entre *S. spiculatus* y *O. albifasciatus*. La variación de la altura del cuerpo de agua donde ocurren las infecciones y la relación parásito-hospedador utilizada en las mismas, no afecta el parasitismo de *S. spiculatus* en larvas de *O. albifasciatus*, al menos en el rango utilizado en este estudio. Además, la alta proporción de postparásitos emergidos en los tratamientos donde se utilizó una gran cantidad de formas infectantes, podría indicar que existe algún tipo de regulación de la cantidad de nematodos que parasitan cada larva de mosquito para evitar una mortalidad denso-dependiente.

En relación al comportamiento, el aumento del tiempo dedicado a la alimentación en la pared por parte de las larvas de los tiempos de dormancia más largos, podría ser el resultado de la búsqueda de alimento para compensar una mayor deficiencia de reservas energéticas comparadas con larvas provenientes de huevos de tiempos cortos. Los resultados de este estudio mostraron que el tiempo de dormancia de los huevos fue un factor más relevante que el parasitismo, en relación al cambio de comportamiento de las larvas. La falta de relación entre los comportamientos y el parasitismo sugiere una gran tolerancia de *O. albifasciatus* al desarrollo parasítico de *S. spiculatus* (hasta que finalmente muere por la emergencia de este último).

ABSTRACT

BIOLOGICAL AND BEHAVIORAL ASPECTS OF LARVAE OF *OCHLEROTATUS ALBIFASCIATUS* (DIPTERA: CULICIDAE) PARASITIZED BY *STRELKOVIMERMIS SPICULATUS* (NEMATODA: MERMITHIDAE)

Ochlerotatus albifasciatus Macquart, is the mosquito of sanitary importance most widely distributed in Argentina, registered in all provinces with the exception of San Juan and San Luis. This species exhibits an aggressive feeding behavior, attacking mammals, mainly equines, cattle and humans, and their dramatic population increases have been related to the occurrence of epizootic or epidemic outbreaks. Among the diseases related to this species are those produced by the virus Cache Valley, Laguna Larga, and Western Equine Encephalitis, the latter responsible for several epizootics that occurred in the temperate zone of Argentina.

The immature stages of *O. albifasciatus* develop in temporary or ephemeral pools and the nematode *Strelkovimermis spiculatus* Poinar and Camino 1986 is the principal natural enemy, which produces infections that can reach 100 percent mortality in some larval populations. Because of its high specificity and high levels of parasitism, this parasite has been proposed as a candidate for the biological control of culicids.

The general objective of this thesis was to contribute to the knowledge of the interaction and parasite-host dynamics between the nematode *S. spiculatus* and the floodwater mosquito *O. albifasciatus*.

Three experiments were carried out under laboratory conditions using larvae of *O. albifasciatus* hatched from eggs laid by females collected in a natural environment. Infective forms of the nematode were obtained from a colony initiated with parasites collected from a natural infection of *O. albifasciatus*. Samples were taken in the surroundings of the city of La Plata and the experiments were carried out under controlled conditions of light and temperature in the bioassay rooms of the Instituto de Limnología Dr. Raúl Ringuelet, UNLP - CONICET.

The first experiment aims to evaluate the parasitism by *S. spiculatus* in larvae of *O. albifasciatus* from eggs of different periods of dormancy. The hypothesis related to this objective was that the long dormancy of the eggs induces the larvae hatching from them to be more susceptible to the parasitism produced by *S. spiculatus*.

The proportion of *O. albifasciatus* parasitized in the first experiment varied significantly between 0.20 and 0.47, but no unidirectional change with the increase in the dormancy time of the eggs was observed. The number of melanized nematodes found inside the dead larvae was not related to the increase in the dormancy time of the eggs, nor to the intensity of the parasitism.

On the other hand, the stage specific mortality of the infected individuals was higher in the fourth larval instar of development and lower in the second larval instar and in the pupal stage, in all the treatments. During this experiment the survival of the larvae was low, except for those from eggs of four months of dormancy.

The second experiment aims to evaluate the prevalence and intensity of parasitism of *S. spiculatus* in *O. albifasciatus* in water columns of five, ten, fifteen and twenty centimeters in height, using a fixed and a variable parasite/host ratio. The hypothesis related to this experiment was that the prevalence and intensity of parasitism increases with the decrease in the height of the water column and with the increase in the parasite/host ratio.

The proportion of parasitized larvae in infections with fixed parasite-host relationship ranged from 0.15 to 0.55, without significant differences among the different heights of the water columns. The number of nematodes found per host ranged between one and five and was not related to the height of the water column. The proportion of postparasites emerged from the total parasites in each host showed no differences among treatments.

The proportion of parasitized larvae in the infections with different parasite/host relationship, varied between 0.55 and 0.85, without significant differences in relation to the parasite-host relationships used. The intensity of the parasitism did not differ significantly between different treatments. Between one to nine nematodes per larva were observed, and the average ranged between 2.27 in the 30:1 ratio treatment, and 4.15 in the 15:1 ratio treatment. The proportion of postparasites emerged from the total of nematodes that parasitized

each larva of *O. albifasciatus* ranged between 0.83 and 1, and no differences among treatments were detected.

For the third experiment two objectives were proposed, the first was to evaluate if the parasitism produced by *S. spiculatus* affects the behavior of *O. albifasciatus*. The hypothesis proposed in relation to this objective was that parasitized larvae exhibit a decrease in the activity, as compared with non-parasitized larvae. The second objective was to determine if the variation of the dormancy period of the eggs, have some effect on the behavior of the larvae coming from them, whether they are parasitized or not by the nematode. The hypothesis proposed in relation to this objective is that the increase in dormancy periods increases the differences observed in the behavior between parasitized and non-parasitized larvae.

It is the first study that record the behavior of larvae of *O. albifasciatus* under laboratory conditions, and an enormous variability of behavior was observed among larvae exposed to the same conditions. The individuals remained most of the time still, filtering on the surface, swimming by wriggling or moving and feeding near the surface. Only two behaviors of the eight registered, the wriggling and feeding on the wall, varied depending on the dormancy period of the eggs and none did so in relation to the parasitism produced by *S. spiculatus*.

According to the results obtained in this thesis, there is great variability in parasitism in larvae from eggs of different dormancy periods, but this variation can not be attributed univocally to the time elapsed. That is, larvae from eggs of prolonged dormancy would not necessarily be parasitized in greater proportion or with greater intensity than those of relatively shorter times. The low proportion of parasitized larvae in most of the infections carried out, compared with other studies, could be related to the methodology used at the time of infection and to the use of *O. albifasciatus*, the natural host of the nematode.

The variability observed in the evaluated parameters of the present study, helps to understand the interaction between *S. spicualtus* and *O. albifasciatus*. The variation of the height of the body of water where the infections occur and the parasite/host relationship used in the experiment, does not affect the parasitism in *O. albifasciatus*, at least in the range used in this study. In addition, the high proportion of postparasites emerged in the treatments where a large number of infective forms were used, could indicate that there is some type of

regulation of the amount of nematodes that parasitize each mosquito larva to avoid a dense-dependent mortality.

In relation to the behavior, the increase in the time dedicated to the feeding on the wall by the larvae of the longest dormancy period, could indicate the search for food to compensate a greater deficiency of energy reserves compared with larvae coming from short dormancy periods. The results of this study showed that the dormancy period of the eggs was a more relevant factor than the parasitism, in relation to the behavior change of the larvae. The lack of relationship between behavior and parasitism suggests a high tolerance of *O. albifasciatus* to the parasitic development of *S. spiculatus* (until they finally die because of the emergence of the parasite).

INTRODUCCIÓN GENERAL

Teniendo en cuenta la cantidad de personas que se infectan anualmente por enfermedades transmitidas por mosquitos, se podría decir que estos, entre la enorme diversidad de insectos con los cuales convivimos, son los que más modifican nuestra vida. Si bien sólo algunas de estas especies tienen relevancia sanitaria, las enfermedades que transmiten están entre las de mayor incidencia a nivel global (OMS, 2017a). Los mosquitos son insectos del orden Diptera, pertenecientes a la familia Culicidae, la cual incluye alrededor de 3500 especies distribuidas en dos subfamilias Anophelinae y Culicinae (Knight y Stone, 1977). El conocimiento de su diversidad, biología, ecología y otros aspectos relacionados a ellos, resulta indispensable para implementar medidas de control efectivas contra la propagación de sus poblaciones y las enfermedades que transmiten. En las últimas décadas, la expansión de la distribución de las especies vectoras, el aumento de sus poblaciones y el surgimiento de resistencia a insecticidas, han producido un incremento en el interés por el control biológico de estos insectos. En este sentido, los nematodos de la familia Mermithidae han sido propuestos como eficaces agentes de control para culícidos por su especificidad y la alta mortalidad que son capaces de producir (Platzer, 2007). Sin embargo, el control de culícidos mediante la utilización de estos parásitos reviste una gran complejidad, ya que los factores que influyen en la infectividad en sus organismos blancos, son variados y actúan de manera poco conocida en la naturaleza.

Inicio de los estudios sobre mosquitos

Las primeras escrituras sobre la posición sistemática, la biología y los ataques de los mosquitos se dieron a finales del siglo XVIII y principios del XIX (Christophers, 1960). En 1881, Finlay descubrió la intervención de *Aedes aegypti* (Linnaeus) en la transmisión del virus de la fiebre amarilla (Finlay, 1881; Christophers, 1960), y en ese mismo año King propondría a los mosquitos como transmisores de la malaria (Kohn Loncarica *et al.*, 1997), lo cual sería confirmado por Ross y Smyth (1897) al incriminar el género *Anopheles* Meigen en dicha

transmisión. Estos descubrimientos generarían en los años siguientes un aumento del interés en los estudios sobre los mosquitos de los géneros *Anopheles* y *Aedes* Meigen, y sobre la taxonomía de culícidos en general. En Argentina, los primeros estudios sobre culícidos los llevó a cabo Lynch Arribálzaga (1878), publicando la descripción de tres especies de mosquitos colectados en el país. Luego, el mismo autor (Lynch Arribálzaga, 1891) publica la obra "Dipterología Argentina", la cual se convirtió en una referencia para los estudios posteriores sobre culícidos. En la primera década del siglo XX, las obras de Theobald modificaron sustancialmente la taxonomía de los Culicidae del mundo, al utilizar descripciones del conjunto de los órganos genitales externos y de los estados de larva y pupa. Posteriormente Howard *et al.* (1917) y Dyar (1928) recopilan toda la información sobre los mosquitos de América hasta esas fechas, produciendo cambios, y proponiendo una nueva clasificación de las especies. Cuatro años después, Edwards (1932) publica "Genera Insectorum" en el cual se modifica nuevamente la clasificación de los mosquitos del mundo, reduciendo la cantidad de géneros. Estas modificaciones se debieron principalmente a la utilización del principio de que los diagnósticos genéricos deben ser aplicables a ambos sexos y que la forma de las escamas en diferentes partes del cuerpo proporciona caracteres de importancia secundaria. Por otro lado, Edwards propone el agrupamiento artificial de especies por características particulares dando lugar a la utilización de términos como Complejo, Grupo, Serie, etc., para diferenciar un grupo de especies de otras pertenecientes al mismo subgénero. En 1953, Lane publica la obra "Neotropical Culicidae" en la cual se pasa a sinonimia un gran número de especies. En Sudamérica, los tomos de culicidología médica de Forattini (2002) publicados desde 1965 y la obra "Mosquitoes of Argentina", Parte I, publicada por Darsie (1985) y Parte II, por Mitchell y Darsie (1985), son otros de los aportes relevantes al estudio general y a la taxonomía de los mosquitos.

En Argentina, los brotes de encefalitis equina producidos en la zona templada a inicios de 1900 (Sabattini *et al.*, 1998), y el posterior descubrimiento del agente transmisor, *Ochlerotatus albifasciatus* Macquart (Avilés *et al.*, 1992; Sabattini *et al.*, 1998), incrementaron el interés por el estudio de esta especie. Actualmente existen numerosos grupos de investigación distribuidos en todo el país que desarrollan diversos estudios relacionados con diferentes especies de culícidos (Berón *et al.*, 2016).

Importancia sanitaria de la familia Culicidae

De la enorme diversidad de especies agrupadas en la Familia Culicidae, aquellas incriminadas en la transmisión de patógenos al ser humano y animales domésticos, son relativamente pocas y pertenecen mayoritariamente a los géneros *Anopheles*, *Culex* Linnaeus, *Aedes*, *Ochlerotatus* Lynch Arribálzaga, *Psorophora* Robineau-Desvoidy, *Haemagogus* Williston, y *Sabethes* Robineau-Desvoidy (Service, 2000). Entre los patógenos se pueden mencionar distintas especies de virus, bacterias, protozoos y nematodos, las cuales producen enfermedades como dengue, Zika, chikungunya, fiebre amarilla, encefalitis, paludismo y filariasis (Becker *et al.*, 2010). Para que una especie de mosquito sea considerada vector, no sólo debe presentar la capacidad de alojar un patógeno, permitir su multiplicación, y luego transmitirlo a otro organismo, sino que además debe ocupar un hábitat determinado (p. ej. urbano, rural, silvestre), y presentar una abundancia, longevidad, rango de vuelo, actividad circadiana y preferencia alimentaria, adecuadas para la transmisión del patógeno (Ludlam *et al.*, 1970; Ledesma y Harrington, 2011).

A continuación se presenta la información más relevante sobre las principales enfermedades transmitidas por mosquitos.

En Argentina, en la actualidad el patógeno más relevante transmitido a personas por mosquitos, es el virus del dengue, el cual pertenece al género *Flavivirus* de la Familia Flaviviridae. Este virus, del cual se han descrito cinco serotipos, Den1, Den2, Den3, Den4 y Den5, produce una infección viral sistémica, que puede ser asintomática o generar fiebre leve, fiebre hemorrágica o síndrome de choque por dengue. El principal vector es *A. aegypti*, el cual se distribuye en el norte y centro del país estando presente en todas las provincias excepto Rio Negro, Chubut, Santa Cruz y Tierra de Fuego (Rossi, 2015). Otra especie indicada como posible vector del dengue es *Aedes albopictus* (Skuse) (Vezzani y Carbajo, 2008; Gratz, 2004), la cual ha sido reportada en algunas localidades de la provincia de Misiones (Rossi, 2015). En el mundo se estima que existen 390 millones de infecciones de dengue por año, de las cuales solo se manifiestan aproximadamente 96 millones (Bhatt *et al.*, 2013). Por ejemplo, en el continente Americano, durante el brote epidémico del 2010 se registraron más de 1,7 millones de casos, 50.235 clínicamente severos, y 1.185 muertes

(Brathwaite Dick *et al.*, 2012). La ocurrencia de brotes epidémicos cada 3-5 años en las Américas con un incremento del número de casos a lo largo del tiempo y con la ocurrencia de transmisión autóctona en casi todos los países, muestra un cambio epidemiológico del dengue desde un estado endémico-epidémico hacia uno altamente endémico en los últimos años (Brathwaite Dick *et al.*, 2012).

El virus Zika, pertenece al mismo género que el dengue (*Flavivirus*) y causa un cuadro clínico semejante a este. La principal vía de transmisión es vectorial, por medio de la picadura de mosquitos del género *Aedes*, principalmente *A. aegypti* y *A. albopictus*, aunque también puede transmitirse de persona a persona por medio de relaciones sexuales (Musso *et al.*, 2015). Uno de los aspectos relevantes de este virus es su relación con el síndrome de Guillain Barré, y con la microcefalia (Oliveira Melo *et al.*, 2016) y otros defectos congénitos relacionados con la infección durante el embarazo. Además, su rápida dispersión en países de América del sur desde 2015 hasta la actualidad ocasionó un alerta a los sistemas de salud de los países de la región.

Otro virus emparentado con los anteriores (*Flavivirus*), es el que produce la fiebre amarilla. Esta enfermedad es transmitida en zonas urbanas por *A. aegypti* originando lo que se conoce como ciclo urbano de fiebre amarilla. Por otro lado, en zonas selváticas también están involucradas especies del género *Haemagogus*, los cuales transmiten el virus principalmente a monos y ocasionalmente al hombre cuando este se encuentra en la selva en lo que se conoce como ciclo selvático de la fiebre amarilla (Goddard, 2008). Una ventaja respecto de los otros flavivirus, es que se dispone de una vacuna preventiva eficaz contra la fiebre amarilla.

El virus Chikungunya es otro de los arbovirus de importancia en salud pública. Pertenece al género *Alphavirus*, familia *Togaviridae*, y se transmite principalmente por la picadura de los mosquitos *A. albopictus* y *A. aegypti*. Este virus, de sintomatología similar a los anteriores, se reportó en varios países de América del sur, especialmente del área Andina y del Caribe, constituyéndose al igual que el Zika como otra de las enfermedades emergentes en la región (Marcondes *et al.*, 2017). En Argentina, durante la epidemia de dengue registrada en 2016, se notificaron 322 casos autóctonos (313 en Salta y 9 en Jujuy) por primera vez en el país (MSN, 2016).

Otros patógenos transmitidos por mosquitos que perjudican a aves y mamíferos incluido el hombre, son los virus responsables de diversas encefalitis.

Entre las más importantes se encuentran la Encefalitis Equina Venezolana (EEV), la Encefalitis Equina del Este (EEE), la Encefalitis Equina del Oeste (EEO), la Encefalitis de Saint Louis, la Encefalitis Japonesa y la Encefalitis del Nilo Occidental. Estos virus presentan la capacidad de producir epidemias, con grados variables de morbilidad y letalidad, y son transmitidas por diferentes especies de mosquitos. En Argentina, el uso de vacunas contra la EEE, EEO y Encefalitis del Nilo Occidental ocasionó la disminución de la ocurrencia de estas enfermedades. Por otro lado, la EEV y Encefalitis Japonesa son enfermedades exóticas. Los brotes epidémicos de estas enfermedades constituyen graves problemas debido al impacto negativo en lo económico y social que ocasionan y por sus graves repercusiones en la salud pública (Mesa *et al.*, 2005).

En nuestro país, los últimos reportes de casos de arbovirus corresponden al periodo entre las semanas epidemiológicas 1 a 39 del año 2018 (31 de diciembre 2017 al 15 de septiembre de 2018), donde se notificaron 8.449 casos estudiados en el marco de la vigilancia integrada de arbovirus. De éstos, 7.709 no registraron antecedente de viaje y los 740 restantes correspondieron a casos con antecedente de viaje, previo al inicio de los síntomas, hacia áreas con circulación confirmada de arbovirus. De los casos estudiados sin registro de antecedente de viaje, 1.805 resultaron positivos para dengue, 57 casos positivos para Zika, 14 casos probables de virus de la Encefalitis de Saint Louis y 29 casos de flavivirus sin especificar (MSN, 2018b).

Otros de los patógenos transmitidos por mosquitos que constituyen graves problemas de la salud pública, son los protozoos y nematodos que causan el paludismo y las filariosis respectivamente.

El paludismo o malaria, es una enfermedad febril aguda provocada por diferentes especies de protozoos pertenecientes al género *Plasmodium* Marchiafava y Celli (Haemosporida: Plasmodiidae), y transmitida a personas por mosquitos del género *Anopheles*. Los síntomas, que suelen aparecer luego de 10 o 15 días de la picadura del mosquito infectado, son escalofríos, dolor de cabeza y fiebre. La malaria, principalmente aquella causada por *Plasmodium falciparum* Welch en Africa y *Plasmodium vivax* Grassi y Feletti en las regiones fuera del continente africano como por ejemplo América Latina, se relaciona a manifestaciones clínicas graves como malaria cerebral, anemia severa, aborto espontáneo y parto prematuro durante el embarazo y el síndrome respiratorio agudo severo (Rodríguez Morales *et al.*, 2015). Si bien en los últimos años la incidencia de la enfermedad y la tasa de mortalidad se redujeron a escala

mundial, la transmisión sigue ocurriendo en 91 países y regiones, registrándose 216 millones de casos a escala mundial (OMS 2017b). En Argentina, el área endémica para paludismo, se limita a regiones localizadas en las provincias de Jujuy, Salta y Misiones (Zaidenberg, 2015) y la principal especie implicada en la transmisión es *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald (Dantur Juri *et al.*, 2009). El control de la enfermedad en el país varió a lo largo de los años, produciéndose un descenso del número de casos registrados, a partir de la implementación del Programa de Erradicación del Paludismo en 1959 (Kohn Loncarica *et al.*, 1997; Curto *et al.*, 2013). Actualmente, los casos notificados acumulados son relativamente pocos, 14 y 18 para el año 2017 y el primer trimestre del 2018 respectivamente (MSN, 2018a).

Las filariasis constituyen un grupo de enfermedades producidas por nematodos parásitos del orden Spirurida, superfamilia Filarioidea, los cuales son transmitidos a las personas por la picadura de diferentes dípteros. Estos nematodos pueden desarrollar distintos tipos de filariosis, de acuerdo a la localización del gusano adulto en el hospedador. Así, se pueden nombrar filariosis linfáticas, cutáneas o viscerales, las cuales se caracterizan por una inflamación en los tejidos afectados. Los hospedadores definitivos son mamíferos, principalmente primates y carnívoros, mientras que los hospedadores intermediarios que actúan como vectores, pueden ser diferentes especies de culícidos o simúlidos. Los parásitos responsables de la filariasis linfática son *Wuchereria bancrofti* (Cobbold) y *Brugia malayi* (Brug). El primero de ellos transmitido al hombre por mosquitos de los géneros *Culex* (en áreas urbanas y semi-urbanas de regiones tropicales y subtropicales de Asia, África, Europa y las Américas), *Anopheles* (p. ej. en áreas rurales de África) y *Aedes* (en islas del Pacífico), mientras que *B. malayi*, es transmitido por mosquitos del género *Mansonia* Blanchard (Marquardt *et al.*, 2000). Según la Organización Mundial de la Salud, esta enfermedad amenaza a 856 millones de personas en el mundo (OMS 2017b). En el continente Americano, la filariasis linfática causada por *W. bancrofti* se encuentra ampliamente distribuida (Marquardt *et al.*, 2000). En Argentina, *Dirofilaria immitis* Leidy es la única especie de filaria que ha sido reportada parasitando al ser humano, a animales domésticos y salvajes, involucrando a diferentes especies de mosquitos como vectores. Esta especie es conocida comúnmente como gusano del corazón del perro, y se comprobó que puede desarrollarse hasta el estadio infectante en alrededor de 70 especies de mosquitos de los géneros *Aedes*, *Culex*, *Culiseta* Felt, *Anopheles*, *Mansonia*,

Coquillettidia Dyar y *Psorophora*. Algunas de estas especies solo fueron infectadas en condiciones experimentales, por ejemplo *O. albifasciatus* (Ludlam *et al.*, 1970; Simón *et al.*, 2012).

Importancia sanitaria de *Ochlerotatus albifasciatus*

Ochlerotatus albifasciatus presenta características biológicas que influyen en su rol como potencial vector de arbovirus. Su amplia distribución en América del Sur, encontrándose desde Bolivia, sur de Brasil, hasta el sur de Chile y Argentina (Prosen *et al.*, 1960; Forattini, 1965; Mitchell y Darsie, 1985; Rossi, 2015; Carbajal y Faúndez, 2018), su agresivo comportamiento de alimentación, atacando principalmente a equinos, al ganado vacuno y al hombre, y las explosiones demográficas de sus poblaciones (Ludueña Almeida y Gorla, 1995), son atributos que lo convierten en un vector de relevancia en brotes epizooticos o epidémicos. La especie fue sugerida como potencial vector del nematodo *D. immitis* (Vezzani *et al.*, 2006) y fue relacionada con arbovirus como Cache Valley (Tauro *et al.*, 2009) y Laguna Larga, pertenecientes al serogrupo Bunyamwera, los cuales fueron aislados de hembras de *O. albifasciatus* en la provincia de Córdoba (Sabattini *et al.*, 1985, 1998). Este grupo de virus son responsables de infecciones en humanos y animales domésticos como ovejas, caballos y vacas (Bianchini *et al.*, 1968; Tauro *et al.*, 2015). *Ochlerotatus albifasciatus* también fue relacionado con la transmisión del virus de la Encefalitis de Saint Louis (Díaz *et al.*, 2012) y la EEO. Esta última, responsable de numerosas epizootias ocurridas en la zona templada de Argentina desde inicios de 1900 que sucedían cada 5 a 10 años con una morbilidad entre el 1 y el 40 % (Sabattini *et al.*, 1998). Durante el brote ocurrido a finales del año 1982 y comienzos de 1983, que afectó el norte y el centro del país llegando hasta la provincia de Rio Negro, se aislaron por primera vez cepas epizooticas a partir del mosquito *O. albifasciatus* (Mitchell *et al.*, 1987). Años más tarde la especie fue confirmada como vector competente del virus, bajo condiciones de laboratorio (Avilés *et al.*, 1992). En Argentina se asume que las cepas epizooticas participan de dos ciclos, uno de mantenimiento o primario del cual se desconocen sus componentes y el otro denominado ciclo amplificador, donde participan *O. albifasciatus* y mamíferos de las familias Cavidae y Leporidae (Contigiani *et al.*, 2016). Como medida preventiva existen vacunas comerciales para los virus causantes de encefalitis en equinos (Go *et al.*, 2014).

Biología y ecología de Culicidae

Los mosquitos presentan un ciclo de vida compuesto por cuatro estados, huevo, larva, pupa y adulto (desarrollo holometábolo), de los cuales los tres primeros se relacionan o habitan ambientes acuáticos mientras que el adulto es volador. A su vez, el estado larval está compuesto por cuatro estadios, y es la etapa donde se expresa la mayor diversidad en relación a los ambientes utilizados y a los modos de alimentación. La capacidad de explotar diferentes nichos ecológicos a lo largo de su vida le confiere a los insectos holometábolos, ciertas ventajas comparado con otros organismos que utilizan el mismo nicho durante su ciclo de vida. Por ejemplo la utilización de distintas fuentes de alimento entre inmaduros y adultos, hace que no exista competencia entre ellos por ese recurso. Además de estos aspectos generales, las especies de mosquitos presentan diferentes estrategias de vida relacionadas, por ejemplo, a la alimentación, reproducción, y oviposición, las cuales hacen posible que este taxón esté ampliamente diversificado. Los estados inmaduros pueden desarrollarse en lagos o lagunas de profundidades variables, charcos, pequeños contenedores de agua artificiales, axilas de plantas, huecos en árboles y hojas caídas (Forattini, 2002). Por otro lado, algunas especies pueden ser sensibles a disturbios antrópicos, prefiriendo ambientes silvestres, mientras que otras, sobre todo las invasoras y exóticas, proliferan sin problemas en zonas urbanas (Stein *et al.*, 2016). La alimentación de las larvas puede ser a base de detritos, microorganismos como bacterias, algas o incluso alimentarse de organismos más grandes como invertebrados acuáticos u otras especies de mosquitos. En relación a la permanencia del agua en el sitio de cría, aquellos individuos que utilizan ambientes acuáticos permanentes presentan diferentes estrategias de oviposición, entre ellas, pueden adherir los huevos a la vegetación, generalmente debajo de la superficie del agua (*Aedeomyia* Theobald, *Coquillettidia* y *Mansonia*), depositar los huevos en grupos formando balsas flotantes sobre el agua (*Culex* y *Uranotaenia* Lynch Arribálzaga) o depositar huevos en forma individual en la superficie del agua (*Anopheles*, *Chagasia* Cruz y *Toxorhynchites* Theobald). En este caso los huevos permanecen en contacto con el agua desde que la hembra los deposita, y una vez que la larva de primer estadio está formada en su interior, esta sale del huevo y comienza su vida acuática. Por otro lado, las especies que están adaptadas a ambientes temporarios, principalmente las de los géneros *Aedes*, *Ochlerotatus* y

Psorophora, depositan sus huevos en sustratos húmedos propensos a ser inundados, por ejemplo los bordes de los charcos, las paredes de huecos de árboles o de recipientes artificiales, y estos huevos son capaces de permanecer viables por periodos prolongados de sequia. La eclosión de los huevos puede producirse luego del desarrollo del embrión, cuando el huevo es inundado, o puede demorar un periodo de tiempo variable si las condiciones no son propicias. En este último caso, el individuo detiene su desarrollo permaneciendo en el huevo hasta que las condiciones sean favorables (Campos y Sy, 2006).

Biología y ecología de *Ochlerotatus albifasciatus*

Ochlerotatus albifasciatus es un mosquito adaptado a una amplia variedad de hábitats, su distribución se extiende al norte desde Santa Cruz de la Sierra Bolivia (al oeste) y Rio de Janeiro, Brasil (al este) (Forattini, 1965; Lourenco de Oliveira, 1984) hasta el sur del continente en la provincia de Tierra del Fuego, Argentina (Prosen *et al.*, 1960). Los ambientes acuáticos que utiliza son charcos temporales o efímeros de dimensiones variables formados por agua de lluvia o ambientes inundados formados por desbordes de arroyos o riego artificial, los cuales pueden o no presentar vegetación (Almirón y Brewer, 1996), y se localizan generalmente en llanuras de inundación (Forattini, 1965). Además, las larvas de *O. albifasciatus* se han encontrado en pantanos (Del Ponte y Blaksley, 1947) y en suelos inundados hipersalinos donde crece vegetación halófila del género *Atriplex* Linnaeus (Chenopodiaceae) (Bachmann y Casal, 1962). En cuanto a la altitud se las encontró en ambientes a nivel del mar hasta sitios a 2300 m (Forattini, 1965) y 2700 m (Linares, 2018) sobre el nivel del mar, mostrando que la especie puede explotar una amplia diversidad de hábitats. Las hembras colocan alrededor de 50 a 100 huevos en el suelo húmedo y el embrión completa su desarrollo luego de aproximadamente cuatro días (Ludueña Almeida y Gorla, 1995). Una vez que el desarrollo embrionario esta completo, el huevo puede eclosionar inmediatamente después de las precipitaciones, luego de estar inundado al menos tres horas (Gleiser *et al.*, 2000), o entrar en un período de dormancia si las condiciones no son favorables (Ludueña Almeida y Gorla, 1995). El comportamiento de eclosión se conoce como eclosiones parciales, ya que no todos los huevos de la postura de una misma hembra eclosionan luego de la primera inundación, habiendo algunos que necesitan más de un estímulo para eclosionar (Campos y Sy, 2006). Se ha visto que inundaciones sucesivas

producen eclosiones parciales de las posturas de huevos, y además favorece la respuesta de eclosión de los huevos remanentes durante la siguiente inundación. A pesar de que las bajas temperaturas ambientales antes y durante la inundación disminuyen la respuesta de eclosión (Campos y Sy, 2006), el rango de temperaturas en las cuales se producen eclosiones es amplio, variando desde valores máximos de 30,1 °C en el mes de enero, hasta temperaturas tan bajas como 3,2 °C en el mes de julio (García y Micieli, 2000). Además se reportado que los huevos permanecen viables luego de haber estado expuestos a temperaturas por debajo de 0 °C (Garzón *et al.*, 2013).

El tiempo de desarrollo desde la eclosión del huevo hasta la emergencia del adulto es variable, desde un mínimo de seis días en verano (a una temperatura media de 24 °C) hasta un máximo de 32 días en invierno (a una temperatura media de 13 °C) (Fontanarrosa *et al.*, 2000). Las larvas de *O. albifasciatus* están expuestas al ataque de distintos patógenos, depredadores o parásitos (Campos *et al.*, 2004; Fischer y Schweigmann, 2008), entre los cuales se destaca el mermitido *S. spiculatus*, el cual fue citado como el factor de mortalidad más relevante y la principal causa de epizootias (García *et al.*, 1994; Campos y Sy, 2003; Achinelly y Micieli, 2013). Los factores que influyen en el encuentro de las formas infectantes del nematodo con su hospedador son aun poco conocidos, pero se estima que la cantidad de hospedadores en el ambiente y las señales químicas que producen, pueden estar relacionados (Wang *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2017).

La sincronidad de la emergencia de los adultos junto con condiciones climáticas óptimas, favorecen la ocurrencia de grandes enjambres, característicos de la especie, donde se produce la copula.

La temperatura y los periodos de lluvia son los factores ambientales que más influencia tienen en la disponibilidad de los sitios de cría de esta especie (Fischer *et al.*, 2002), y pueden determinar cambios denso-dependientes en las poblaciones de larvas de los ambientes acuáticos (Gleiser *et al.*, 2000).

Conceptos de control biológico

El control biológico (CB) se puede definir como la acción ejercida por parásitos, patógenos (organismos causantes de enfermedades) o depredadores

para mantener la densidad de población de otros organismos en niveles más bajos de los que existirían sin la acción de estos enemigos naturales (De Bach, 1964). Una de las principales ventajas del CB con parásitos o patógenos es que los depredadores existentes en los ambientes se conservan, ayudando a regular la población de la plaga al consumir los individuos que nacen luego de la implementación de la medida de control. Además, la elección de enemigos naturales nativos de las especies plaga para la acción de CB, aumenta las posibilidades de que estos se establezcan en el ambiente y regulen naturalmente la abundancia de la plaga tiempo después de realizar la intervención. El establecimiento del enemigo natural en el hábitat también implicaría que, de ser necesarias nuevas acciones, estas se realicen mediante un menor esfuerzo comparado al de la intervención inicial.

La utilización de enemigos naturales para controlar organismos plaga es una idea que se conoce desde hace mucho tiempo. Sin embargo, el descubrimiento de químicos insecticidas, habían relegado inicialmente esta práctica. Luego con el advenimiento de problemas en la utilización de estos químicos, como la adquisición de resistencia a los mismos por parte de varias especies plaga de artrópodos (Picollo *et al.*, 2005; Seccacini *et al.*, 2008), la poca efectividad en el control de la plaga a mediano y largo plazo y los perjuicios que ocasiona a otros organismos, a la salud humana, y al ambiente, el control biológico fue recobrando importancia nuevamente. Actualmente, se lo incluye como parte de una estrategia más amplia para el control de plagas, denominada Manejo Integrado de Plagas (MIP), la cual prevé además del CB, el control químico, el monitoreo de la abundancia de la plaga y factores sociales relacionados. Kogan define al MIP como un sistema de apoyo para la selección y el uso de tácticas de control de plagas, coordinadas armoniosamente en una estrategia de gestión, basadas en análisis de costo / beneficio que tienen en cuenta los intereses y los impactos en los productores, la sociedad y el medio ambiente (Kogan, 1998).

La tendencia actual en el control de plagas incorpora la utilización de sustancias derivadas de fuentes naturales (extractos de plantas, patógenos de insectos, etc.) o químicos sintéticos que imitan sustancias naturales como las hormonas de crecimiento de los insectos. Las características principales de estas sustancias son su selectividad a los organismos plagas, modos de acción único, compatibilidad con el control biológico (poco efecto a enemigos naturales), muy baja o nula toxicidad, sin residualidad y de riesgos mínimos para el hombre y medio ambiente. En este caso la utilización de estos compuestos junto con

agentes de control biológico constituye la estrategia conocida como Control Biorracional (Floore, 2007).

El control de las poblaciones de mosquitos no es la excepción a estos cambios de paradigma. Algunos autores, por ejemplo, mencionan tres grandes etapas: Control mecánico 1900-1942; Control químico 1942-1972; y un manejo integrado de mosquitos 1972- presente (Patterson, 2016). Este último, el manejo integrado de mosquitos (IMM), redefinido a partir del MIP, presenta el objetivo de controlar las poblaciones de mosquitos para reducir la amenaza de las enfermedades transmitidas por estos y lograr un bajo nivel de molestias, utilizando los procedimientos y materiales más efectivos y económicos disponibles, y efectuando el menor impacto negativo en el medio ambiente (Metcalf y Novak, 1994 en Floore, 2006).

Los enemigos naturales utilizados en el control de poblaciones de mosquitos incluyen virus, bacterias, microsporidios, ascogregarinas, nematodos Mermithidae, copépodos Cyclopoidea y varias especies de insectos y otros invertebrados predadores de mosquitos inmaduros y adultos (Floore, 2007). Un pre-requisito para el uso de estos organismos es el conocimiento preciso de la biología del enemigo en cuestión y su interacción con el ecosistema. El entendimiento de las relaciones que se establecen entre los depredadores, patógenos o competidores y un organismo de interés es de importancia fundamental para el uso exitoso y ecológicamente correcto de enemigos naturales. Por ejemplo, el parasitismo de *Ascogregarinas sp.* sobre *Aedes triseriatus* en presencia de un depredador de este último, puede provocar una reducción de la mortalidad causada por la depredación en la cohorte del culícido (Soghigian et al., 2017). En este estudio los cambios en el comportamiento de la presa parasitada modificaron la interacción predador-presa, reduciendo la mortalidad de la presa, por lo cual la presencia del parásito en este sistema no colaboraría con la regulación de la población del culícido. Por otro lado, las diferentes especies de mosquitos han desarrollado diversas estrategias de vida adaptándose a hábitats con características abióticas muy variadas, las cuales influyen sobre las interacciones entre los organismos (Juliano 2009). Por lo tanto, si se quiere utilizar enemigos naturales es necesario tener en cuenta de que estos solo pueden reducir exitosamente la población objetivo si sus propias estrategias de vida están adaptadas a la de dicha población.

Importancia de los nematodos Mermithidae como agentes de control de mosquitos

Los nematodos agrupados en la Familia Mermithidae son parásitos obligados de al menos 15 órdenes de insectos (Nickle, 1972) y han sido reportados en una gran variedad de sitios, exceptuando desiertos y zonas polares (Kaiser, 1991). Entre las especies acuáticas, son comunes las que parasitan Diptera, de las familias Chironomidae, Simuliidae, Ceratopogonidae y Culicidae (Petersen, 1973; Camino *et al.*, 2015). Algunos de estos nematodos, por su alta especificidad y los altos niveles de parasitismo que producen, han sido propuestos como candidatos para el control biológico de culícidos (p. ej. Petersen, 1973; Platzer, 1981; Platzer, 2007). El nematodo *Romanomermis culicivorax* Ross y Smith, fue uno de los primeros en ser evaluado como agente de control, encontrándose en éste una buena capacidad para infectar y matar los estados inmaduros de varias especies de mosquitos (Petersen y Chapman, 1979). En Argentina se registraron dos especies de mermítidos parasitando culícidos (Camino *et al.*, 2015), *S. spiculatus* Poinar y Camino en larvas de *O. albifasciatus* e *Hydromermis* sp. (Camino, 1989) en larvas del mosquito *Psorophora* sp., para dos localidades de la provincia de Buenos Aires (Poinar y Camino, 1986). *Strelkovimermis spiculatus* fue evaluado como agente de control en numerosas oportunidades, encontrándose que varias especies de culícidos son susceptibles a este parásito (Becnel y Johnson, 1998) confirmándose una alta sincronidad con su hospedador natural y altos niveles de prevalencia del parasitismo en condiciones naturales (Micieli y García, 1999; Campos y Sy, 2003; Micieli *et al.*, 2012).

El ciclo de vida de *S. spiculatus* es similar al de otros miembros acuáticos de la familia. Los adultos de vida libre, se reúnen formando ovillos al momento de la copula, en los cuales se entrelazan cientos de individuos machos y hembras. Luego de la fecundación, las hembras grávidas se entierran en el sustrato y ponen sus huevos, los cuales pueden soportar periodos de sequía. Una vez finalizado el desarrollo dentro del huevo, la inundación del mismo estimula la eclosión y emergencia de la forma infectiva del nematodo, la cual buscará al hospedador. La infección se produce generalmente por penetración a través de la cutícula de la larva del mosquito. Dentro del hospedador el nematodo se desarrolla durante seis a ocho días, a expensas de la hemolinfa y los tejidos del huésped, aumenta su tamaño y experimenta dos mudas hasta llegar a la forma

postparásito. Esta última forma una vez que abandona al hospedador se desarrolla hasta adulto completando el ciclo de vida (Camino y Reboredo, 1994). Las infecciones naturales en la región templada de Argentina ocurren durante todo el año con variaciones en la prevalencia e intensidad, y ocurrencia de epizootias en todas las estaciones excepto verano (Maciá *et al.*, 1995; Micieli y García, 1999; Campos y Sy, 2003; Micieli *et al.*, 2012).

El parásito *S. spiculatus* es en sentido estricto un parasitoide, ya que infecta un solo hospedador, y este muere cuando el nematodo termina su desarrollo parasítico. Las interacciones parasitoide-hospedador han sido utilizadas como sistemas modelo debido a que la relación trófica que se establece es simple. En la mayoría de los casos un parasitoide ataca solo un hospedador, o varios si estos son gregarios, y de esta interacción dependerá la cantidad futura de parasitoides en la próxima generación. Esto difiere mucho con la depredación, ya que en esta es más difícil predecir en función de una sola captura, la cantidad de depredadores que habrá en la próxima generación (Godfray, 2007). Para la relación entre *S. spiculatus* y *O. albifasciatus*, se cumple la premisa de que la abundancia de las larvas de mosquito durante la infección, incide sobre la cantidad de parásitos en la próxima generación. Así, la variación de la abundancia de ambas especies a lo largo del tiempo sigue un patrón similar, y está fuertemente determinada por la periodicidad de las lluvias (Micieli *et al.*, 2012).

Durante las epizootias en larvas de *O. albifasciatus*, la prevalencia del parasitismo puede alcanzar valores de hasta 100% (Micieli y Garcia, 1999), por lo cual este nematodo es el principal regulador de las poblaciones de *O. albifasciatus* en estos contextos.

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de la interacción y la dinámica parásito-hospedador que se establece entre el nematodo *Strelkovimermis spiculatus* y el mosquito de inundación *Ochlerotatus albifasciatus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estudiar la susceptibilidad al parasitismo por *S. spiculatus* en larvas de *O. albifasciatus* provenientes de huevos con diferentes tiempos de dormancia.
- 2) Evaluar el parasitismo producido por *S. spiculatus* sobre *O. albifasciatus* variando la relación parásito-hospedador y la altura de la columna de agua.
- 3) Evaluar el comportamiento de las larvas parasitadas respecto de las no parasitadas en cohortes provenientes de huevos con diferentes tiempos de dormancia.

HIPÓTESIS GENERAL

El parasitismo producido por *S. spiculatus* afecta en forma diferencial a las larvas de *O. albifasciatus* en función de características biológicas y ecológicas de estas y de características físicas del ambiente.

HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

1- El parasitismo producido por *S. spiculatus* afecta en forma diferencial a los individuos de *O. albifasciatus* en función de la edad de los huevos, aumentando la susceptibilidad al parasitismo en aquellas larvas que provienen de huevos que experimentaron periodos de dormancia prolongados.

2- El parasitismo producido por *S. spiculatus* varía en función de la altura de la columna de agua y la relación parásito-hospedador, incrementándose la prevalencia e intensidad de la infección cuando disminuye la altura de la columna de agua y cuando aumenta la relación parásito-hospedador.

3- El comportamiento de las larvas de *O. albifasciatus* difiere entre aquellas parasitadas por *S. spiculatus* y sus pares no parasitadas, y entre larvas provenientes de huevos con distintos tiempos de dormancia. Los individuos

parasitados y provenientes de huevos con mayor tiempo de dormancia, dedican más tiempo a la alimentación que sus pares no parasitados y de huevos de periodos cortos.

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

Limitaciones relacionadas con el muestreo y la cría de *Ochlerotatus albifasciatus*

La dinámica poblacional de *O. albifasciatus* está determinada en gran medida por las condiciones meteorológicas. La especie suele experimentar explosiones demográficas en determinadas épocas del año cuando las condiciones son favorables, y permanecer con abundancias menores el resto del tiempo. Esta periodicidad no es constante de un año al siguiente, pudiendo transcurrir diferentes periodos de tiempo entre los eventos de abundancia. De esta manera, la fluctuación periódica de la cantidad de *O. albifasciatus* en el ambiente determina el momento preciso cuando se llevará a cabo el muestreo, considerando las épocas de explosión demográfica de la población como las adecuadas para esta tarea.

Los individuos adultos de *O. albifasciatus* no copulan en condiciones de laboratorio, por lo tanto, hasta la fecha, no fue posible mantener una colonia en cautiverio de esta especie. La cría de los individuos debe iniciarse utilizando huevos provenientes de hembras capturadas en la naturaleza, las cuales son alimentadas con sangre de animal de laboratorio e inducidas a oviponer en condiciones controladas de cautiverio. La alimentación de las larvas no se encuentra estandarizada, por lo que en cada estudio, esta varía según el criterio del investigador. En los experimentos de esta tesis se utilizó alimento balanceado para conejos molido y tamizado como alimento para las larvas, debido a que este, a diferencia de otros alimentos artificiales usados para la cría de mosquitos, se asemeja más a los detritos de origen vegetal presentes en los ambientes acuáticos naturales de esta especie.

Descripción y caracterización de los sitios de captura de *Ochlerotatus albifasciatus*

Muestreo de *Strelkovimermis spiculatus* y adultos de *Ochlerotatus albifasciatus*

El sitio de muestreo donde se registró el parasitismo por *S. spiculatus* (Fig. 1) se localiza en Punta Lara (34°49'20,6"S - 57°58'6"O), Partido de Ensenada, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Es una zona parqueada de forma rectangular con una superficie aproximada de 100 metros cuadrados, próxima a un camino pavimentado. El área está cubierta por gramíneas y presenta un grupo de arboles (*Eucalyptus globulus* Labillardière) formando dos hileras en uno de los lados. El suelo, considerablemente deprimido en relación al camino, presenta un charco superficial de agua de lluvia, cubierto de hierba y expuesto a la luz directa del sol durante una parte del día.



Figura 1. Ambiente de cría de *Ochlerotatus albifasciatus*, donde se recolectaron mosquitos adultos y larvas parasitadas por *Strelkovimermis spiculatus*.

El segundo ambiente donde se recolectaron adultos de *O. albifasciatus* está localizado en la Reserva de la Biósfera Parque Pereyra Iraola (34°51'20.6"S - 58°07'54.5"O), provincia de Buenos Aires, Argentina. La mayor parte del sitio se

encuentra densamente arbolado con algunos espacios sin árboles cubiertos de gramíneas. Los adultos fueron capturados en las inmediaciones de un charco de 20 metros cuadrados, formado en la depresión del suelo debajo de un grupo de arboles (*Liquidambar styraciflua* Linnaeus y *Quercus robur* Linnaeus).

Captura de *Ochlerotatus albifasciatus* adultos –obtención de huevos– y almacenaje

Las hembras de *O. albifasciatus* fueron capturadas manualmente utilizando un aspirador mientras el operario actuaba como cebo. Una vez capturados, los ejemplares fueron colocados en jaulas cúbicas de madera y acrílico de 50 centímetros de lado y luego se transportaron al laboratorio (Fig. 2). En el laboratorio se les suministró una solución de agua azucarada (10%) como alimento, la cual se dispuso en frascos con tapas agujereadas por donde emergía un algodón embebido con la solución. Las hembras fueron alimentadas con sangre de cobayo (*Cavia guianae* Thomas; Rodentia: Caviidae) como fuente proteica para favorecer la maduración de los huevos, y luego cada hembra alimentada se aisló en un frasco de acrílico conteniendo un paño en su base y papel absorbente humedecido en la pared interna como sustrato para que ovipusiera (Fig. 3 A).

Los huevos recolectados fueron dispuestos en cápsulas de Petri con un paño y papel absorbente húmedo en su base (Fig. 3 B), y una vez cerradas las capsulas, estas se cubrieron con papel films para mantener la humedad durante el tiempo de almacenaje. Las cápsulas de Petri conteniendo los huevos (Fig. 3 C) fueron guardadas en oscuridad en un cuarto con temperatura controlada, la cual se mantuvo constante a 23 °C, hasta cumplirse el tiempo de dormancia requerido para cada tratamiento.



Figura 2. Jaulas para el mantenimiento y la alimentación de hembras de *Ochlerotatus albifasciatus*.

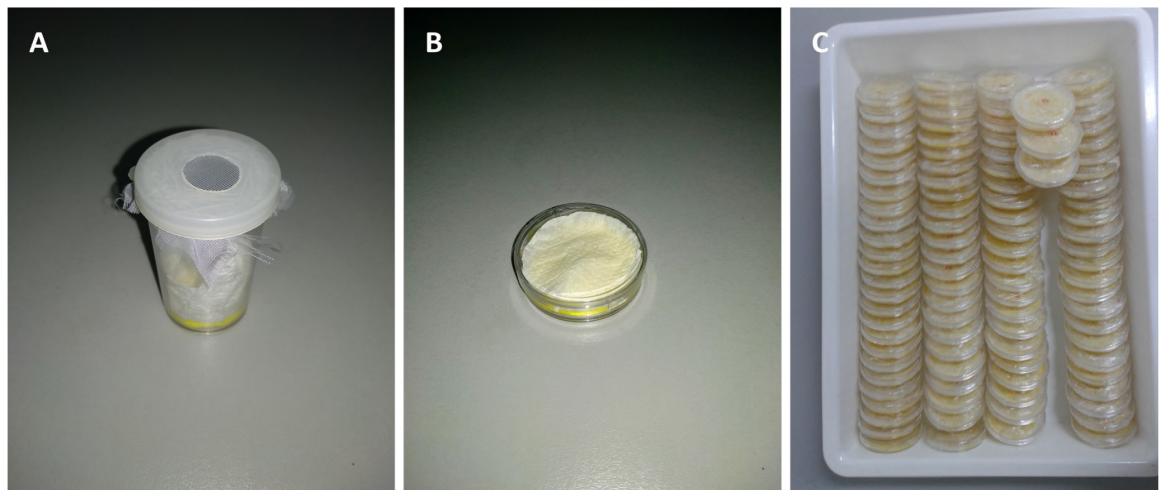


Figura 3. Obtención de huevos de *Ochlerotatus albifasciatus*. A) Recipiente para la mantención individual de hembras grávidas con sustrato para la obtención de huevos. B) Cápsula de Petri con paño y papel absorbente para el almacenamiento de los huevos de la postura de cada hembra. C) Huevos almacenados.

Captura de larvas de *Ochlerotatus albifasciatus* parasitadas y obtención de *Strelkovimermis spiculatus*

Los nematodos fueron obtenidos de larvas de *O. albifasciatus* que se encontraban finalizando el cuarto estadio de desarrollo, las cuales fueron capturadas en la localidad de Punta Lara, Ensenada. Para la recolección de los individuos se utilizaron cucharones de 300 ml, tamices y baldes para la contención de las larvas junto con agua del charco (Fig. 4). Los individuos colectados fueron trasladados al laboratorio donde se los colocó en bandejas plásticas de 52 x 38 x 7 cm con agua de clorada y se incorporó levadura *ad libitum* como alimento. Se eliminaron posibles depredadores y restos vegetales que puedan intervenir en la emersión del nematodo o en la posterior recolección de este (Anexo, Fig. 1). Una vez que los nematodos emergen de las larvas del mosquito (Fig. 5), comienzan a entrelazarse formando un ovillo (Fig. 6), lo cual facilita la recolección de los mismos. Los nematodos fueron colocados en cápsulas de Petri de 10 cm de diámetro con agua de clorada e identificados taxonómicamente utilizando la descripción de Poinar y Camino (1986).



Figura 4. Elementos para la recolección de larvas de *Ochlerotatus albifasciatus*. Cucharones, botellas lavadoras, redes, tamices, bandejas, pipetas y baldes.



Figura 5. Larva de *Ochlerotatus albifasciatus* y juvenil de *Strelkovimermis spiculatus* recién emergido.



Figura 6. Ovillo de juveniles de *Strelkovimermis spiculatus*, formado entre una y dos horas después de la emergencia del cuerpo de las larvas de *Ochlerotatus albifasciatus*.

En el transcurso de la tesis se repicó la colonia de *S. spiculatus* utilizando *A. aegypti* como hospedador, debido a que hasta el momento, no se logró que *O. albifasciatus* complete su ciclo de vida en cautiverio.

Inicio y mantenimiento de la colonia de *Aedes aegypti*

La cría en laboratorio de *A. aegypti*, se inició utilizando huevos que se colectaron por medio de ovitrampas en los alrededores de la ciudad de La Plata durante el periodo estival del año 2014. Los huevos fueron dispuestos sobre papel, dentro de bolsas herméticas de nylon en una habitación con temperatura controlada a 27 °C hasta el momento que fueron inundados para obtener larvas. La inundación de los huevos se realizó con agua de clorada en bandejas plásticas de 52 x 38 x 7 cm y las larvas fueron alimentadas *ad libitum* con una mezcla en cantidades iguales de levadura y alimento disecado para peces. Durante la cría, las bandejas fueron revisadas diariamente para controlar que la calidad del agua no se altere por el exceso de alimento o por la presencia de individuos muertos. Una vez que los individuos alcanzaron el estado de pupa, se colocaron en recipientes con 200 ml de agua, dentro de jaulas cubicas de madera y acrílico, de 50 cm de lado, adecuadas para contener a los adultos. Como alimento para los adultos se utilizó una solución azucarada al 10 % provista en frascos con tapas agujereadas por donde sobresalía un algodón en contacto y embebido con la solución. Luego de una semana de la emergencia de los adultos, se introdujo un Cobayo (*Cavia porcellus*, Linnaeus) como fuente de sangre para alimentar a las hembras y permitir la maduración de sus huevos. Los huevos obtenidos constituyeron la F1 con la cual se fundó la colonia inicial.

Al momento de iniciar la colonia, los huevos fueron inundados y las larvas fueron criadas hasta la obtención de pupas, según el procedimiento detallado anteriormente. Los mosquitos adultos se mantuvieron en jaulas, en una habitación a 27 °C y un ciclo de luz:oscuridad de 14:10 horas. Se les proveyó agua azucarada como alimento, y cada 15 días se les ofreció sangre de cobayo a las hembras, para permitir el desarrollo de los huevos. Para la recolección de los huevos se dispusieron, dentro de la jaula, frascos negros recubiertos interiormente con papel absorbente de color madera y conteniendo agua cubriendo hasta la mitad del papel.

Las posturas se retiraron una vez por semana, se secaron al aire, y fueron guardadas en recipientes herméticos en oscuridad a 27 °C. Al momento de ser utilizadas, las posturas se sumergieron en agua con levadura para estimular la eclosión.

Los adultos que completaban dos ciclos gonotróficos eran eliminados y las jaulas que los contenían eran desinfectadas con alcohol 96°. Luego se procedía con la obtención de adultos para comenzar un nuevo ciclo.

Inicio y mantenimiento de la colonia de *Strelkovimermis spiculatus*

En condiciones de laboratorio, los nematodos juveniles provenientes de las larvas de *O. albifasciatus* recolectadas en campo, fueron colocados en cápsulas de Petri conteniendo agua y arena de cuarzo como sustrato para los huevos (Fig. 7). Una vez que los nematodos se enterraron en la arena, se eliminó el agua libre y la cápsula fue sellada herméticamente y almacenada en oscuridad.

Los repiques de la colonia se realizaron una vez por mes, utilizando capsulas de petri con huevos de nematodos que no hayan sido guardados por más de 2 meses, para asegurar una provisión de individuos jóvenes en todo el estudio. El procedimiento consistió en la inundación de los huevos contenidos en la arena dentro de las cápsulas, con agua de clorada, y 12 horas después, el agua junto con las formas infectantes (J2) provenientes de los huevos del nematodo fueron recolectados y colocados en recipientes nuevos. La estimación de la cantidad de formas infectantes se realizó por medio de diluciones seriadas con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Para realizar la infección, se utilizaron bandejas plásticas con agua donde se colocaron las formas infectantes y larvas de segundo estadio de *A. aegypti* en una relación numérica de 5 a 1 (parásito-hospedador). Luego de 24 horas de exposición a los parásitos, las larvas se trasvasaron a bandejas de cría, donde se alimentaron con una mezcla de levadura y alimento disecado para peces hasta la emersión del nematodo. Las formas postparásitas o juveniles de cuarto estadio de *S. spiculatus* (J4) se colectaron del fondo de las bandejas y se colocaron en cápsulas de Petri con arena de cuarzo con la finalidad de que se desarrollen hasta el estado adulto, se reproduzcan y coloquen sus huevos en la arena. Finalmente las cápsulas se almacenaron en oscuridad hasta el momento de repetir el ciclo.

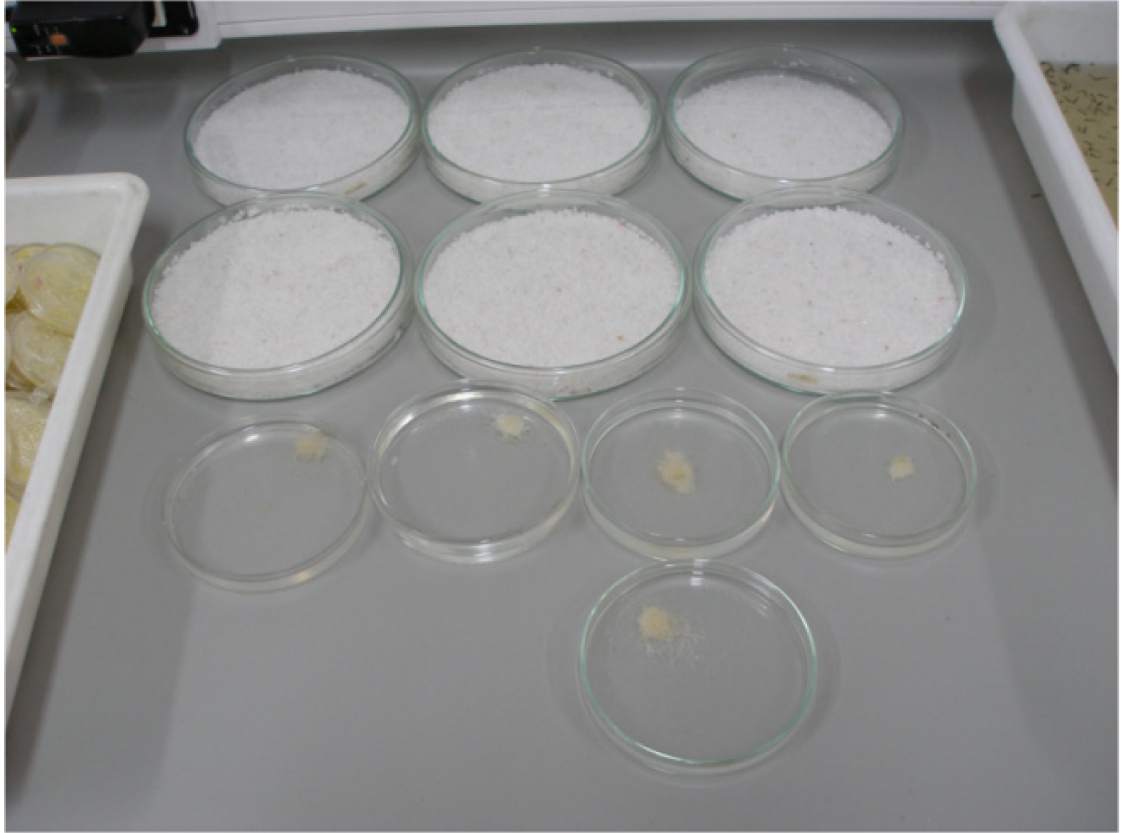


Figura 7. Inicio de la colonia de *Strelkovimermis spiculatus*. Se distinguen cápsulas de Petri con arena de cuarzo donde serán colocados los ovidos de nematodos que se encuentran en las cápsulas de Petri con agua.

CAPÍTULO I

Susceptibilidad al parasitismo de *Strelkovimermis spiculatus* en larvas de *Ochlerotatus albifasciatus* provenientes de huevos con diferentes tiempos de dormancia

I. Introducción

Es probable que múltiples factores influyan sobre la probabilidad de infección de *O. albifasciatus* por parte de *S. spiculatus*. Entre estos, el estado fisiológico del hospedador, relacionado con su historia de vida, podría ser importante. Los huevos de *O. albifasciatus* pasan por distintos periodos de dormancia dependiendo de la fecha de puesta, las condiciones ambientales, y la predisposición de los huevos individuales para eclosionar, por lo cual es esperable que tengan distintos niveles de reservas energéticas, lo cual podría afectar la supervivencia de las larvas luego de su eclosión. Por ejemplo en otra especie con huevos de resistencia, *A. aegypti*, el detrimento en las reservas energéticas de los huevos por la extensión de los periodos de dormancia, afecta la fisiología y supervivencia de las larvas recién nacidas cuando estas son expuestas a factores de estrés (Pérez y Noriega, 2012).

El estado fisiológico de la larva también afecta su sistema inmunológico. Una reacción de defensa, común de los mosquitos, es la síntesis y depósito de capas de melanina sobre el cuerpo del patógeno, produciendo su encapsulamiento (Christensen *et al.*, 2005; Yassine *et al.*, 2012; Barreaux *et al.*, 2016). La melanina participa en varios procesos fisiológicos, como la formación del corion del huevo, el curtido de la cutícula o durante heridas en el cuerpo y su utilización en la defensa se ve afectada, si el mosquito no presenta un buen estado nutricional (Koella y Sorensen, 2002).

El objetivo de este estudio fue evaluar el parasitismo producido por *S. spiculatus* en larvas de *O. albifasciatus* provenientes de huevos con diferentes tiempos de dormancia. Para ello se planteó la hipótesis de que los tiempos largos de dormancia de los huevos, inducen a las larvas provenientes de ellos, a ser más susceptibles al parasitismo producido por *S. spiculatus*. Esta susceptibilidad se expresaría en distintos aspectos, como el incremento de la prevalencia del parasitismo, el incremento de la intensidad de la infección, o la disminución de la cantidad de retenciones y/o melanizaciones de parásitos.

I. Materiales y métodos

Diseño experimental y procedimientos

El experimento consistió en la exposición de larvas de *O. albifasciatus*, provenientes de huevos con distintos tiempos de dormancia, a la infección por el parásito *S. spiculatus*. Se dispusieron cinco tratamientos, de acuerdo a los tiempos de dormancia de los huevos de 2, 4, 6, 8 y 10 meses. Cada tratamiento con un tiempo diferente al resto. Para cada tratamiento se formaron dos grupos de individuos, el primero destinado a la exposición a *S. spiculatus* y el otro como grupo control, sin exposición al nematodo. La unidad experimental consistió en un recipiente conteniendo una larva de *O. albifasciatus*. Para cada tratamiento se utilizaron 300 unidades experimentales, 150 para el grupo control y 150 para el grupo de individuos expuestos al nematodo, a excepción del tiempo de dos meses en el que se usaron 100 unidades para el grupo expuesto y 50 para aquel sin exposición al nematodo.

El desarrollo del experimento transcurrió en una habitación con temperatura constante a 23 °C y fotoperiodo de luz/oscuridad de 12:12 horas.

Las larvas de *O. albifasciatus* fueron obtenidas sumergiendo los huevos en 40 ml de agua de clorinada y 10 mg de alimento para peces, en una cápsula de Petri, durante 24 horas. Luego del período de inmersión, las larvas fueron transferidas a bandejas de mayor volumen y alimentadas *ad libitum* con alimento balanceado para conejo (el cual fue previamente molido y tamizado), hasta alcanzar el segundo estadio de desarrollo. Una vez alcanzado este estadio, los individuos fueron asignados al tratamiento de infección o al grupo control para dar inicio al experimento.

Las formas infectantes de *S. spiculatus* se obtuvieron inundando durante 24 horas las cápsulas en donde los nematodos fueron criados. Transcurrido ese tiempo se extrajo el agua junto con las J2, las cuales fueron separadas en grupos de cinco bajo lupa binocular y luego colocadas en recipientes (Fig. 1) conteniendo una solución formada por 10 ml de agua y 3 mg de alimento balanceado para conejos como alimento para la larva de *O. albifasciatus*. En cada recipiente, luego de una hora de la introducción de las J2, fue incorporada una larva de mosquito de tal forma de establecer la relación exacta de 5:1

parásito/hospedador. Luego de 24 horas de exposición, las larvas de *O. albifasciatus* fueron trasvasadas a recipientes individuales de 200 ml (Fig. 2) y criadas con el agregado diario de 10 mg de alimento por larva, hasta la emergencia del parásito o hasta que alcanzaron el estado de pupa. Para el grupo control se siguió el mismo procedimiento pero sin exponer los individuos al parásito. Cada individuo expuesto al parásito, que alcanza el estado de pupa, fue colocado en un frasco de acrílico de 3 cm de diámetro y 7 cm de alto, con tapa, para contener al adulto una vez que este emerge.

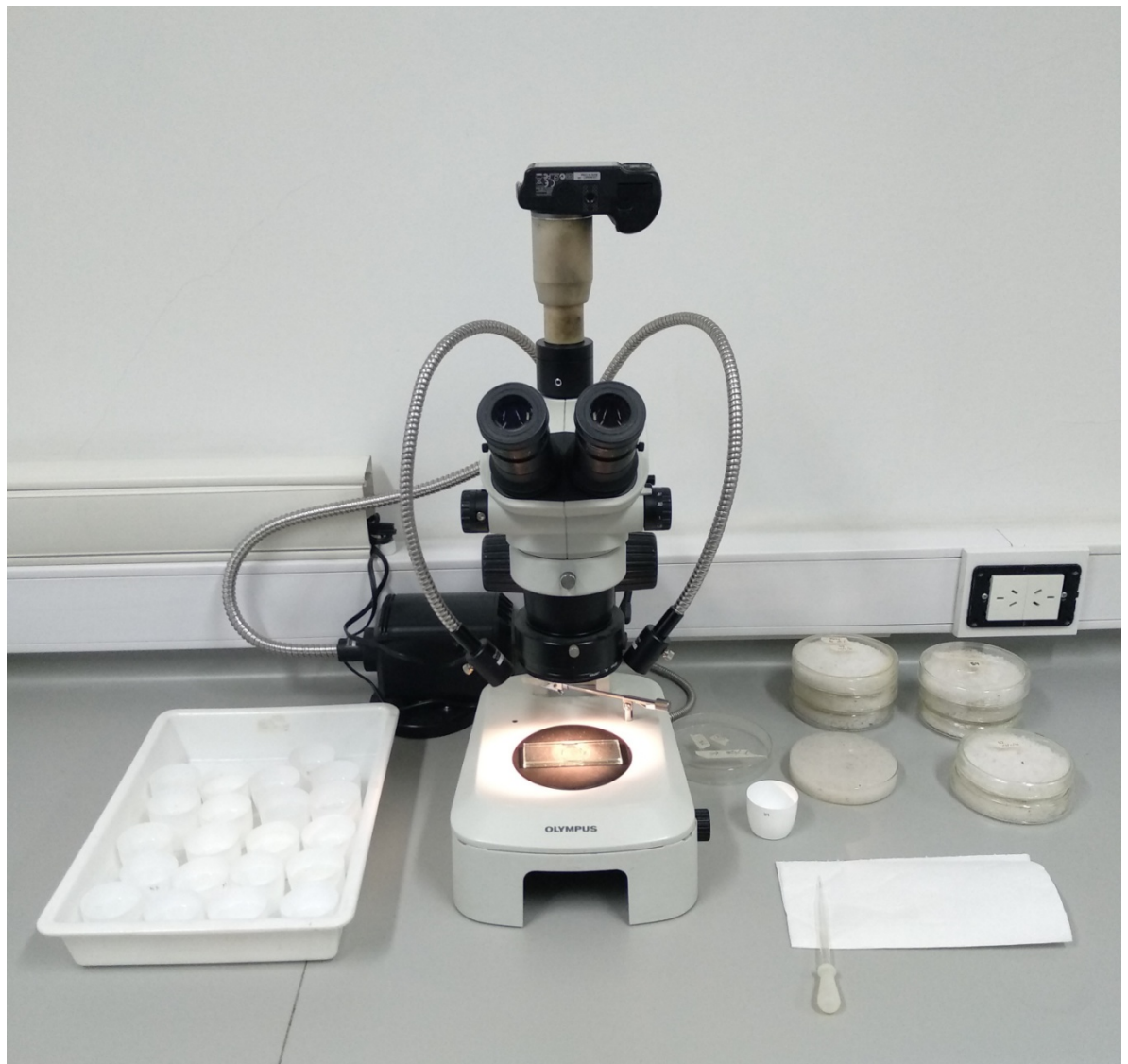


Figura 1. Inundación de huevos de *Strelkovimermis spiculatus* contenidos en cápsulas de Petri (derecha), conteo y separación bajo lupa de formas infectantes y trasvaso a recipientes (izquierda) para la infección de larvas de *Ochlerotatus albifasciatus*.



Figura 2. Cría de *Ochlerotatus albifasciatus* luego de la exposición, o no exposición, al nematodo.

Todos los recipientes fueron revisados diariamente, registrando el estadio de desarrollo de cada individuo y si estaba vivo o muerto. Además, se verificó el parasitismo de los individuos del tratamiento de infección, registrando la presencia de J4 libres en el fondo de cada recipiente, la presencia de nematodos retenidos dentro del cuerpo del hospedador muerto y la presencia de parásitos en los individuos que sobrevivieron hasta el estado adulto. Para determinar el parasitismo en hospedadores muertos y en adultos se realizaron disecciones mediante agujas entomológicas utilizando un microscopio estereoscópico. Para cada individuo se registró la presencia de parásitos (parasitismo), el número de parásitos (intensidad del parasitismo) y el número de parásitos retenidos (independientemente de que los parásitos estuvieran vivos o muertos). Entre los nematodos retenidos se contabilizó aquellos que se encontraron encapsulados por melanización (parásitos con una región o la totalidad de la superficie del cuerpo cubierta por capas de melanina) y los que no.

Análisis de los datos

Los datos fueron analizados mediante Modelos Lineales Generalizados (MLG), prueba de Kruskal-Wallis y correlación de Spearman, utilizando el

programa estadístico InfoStat versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017) vinculado con el software R mediante el componente DCOM.

La proporción de larvas de *O. albifasciatus* parasitadas se calculó como el número de individuos parasitados, dividido el total de individuos expuestos a las formas infectantes del nematodo. Esta variable se indicó como variable dependiente, y se comparó entre tiempos de dormancia (variable independiente) por medio de MLG, usando una distribución binomial con función de enlace logit, la cual es adecuada para ensayos independientes (exposición de cada larva de mosquito a las formas infectantes) con la misma probabilidad de éxito (larva infectada) entre sí. El análisis de las diferencias entre las medias de cada tratamiento se realizó utilizando la prueba de Fisher con un nivel de significancia del 0,05 %.

La intensidad del parasitismo (número de nematodos encontrados por larva) se analizó con MLG, indicando a está como variable dependiente, y se comparó entre los distintos tiempos de dormancia (variable independiente), utilizando una distribución gamma con función de enlace logarítmica, adecuada para variables continuas positivas, que no toman el valor cero (Faraway, 2006). La diferencia mínima significativa entre los tiempos de dormancia se obtuvo por medio de la prueba de Fisher ($p < 0,05$).

La proporción de nematodos retenidos del total de nematodos que parasitó cada hospedador, se indicó como variable dependiente y se analizó en función de los tiempos de dormancia, mediante MLG, usando una distribución Binomial con función de enlace logit, adecuada para proporciones.

Teniendo en cuenta que la intensidad de la infección podría afectar la probabilidad de retención de nematodos, se comparó el número de nematodos retenidos por larva entre los distintos tiempos de dormancia, analizando por separado cada intensidad de retención. Para este análisis se uso MLG con distribución Binomial y función de enlace logit.

Por otro lado, se calculó la proporción de hospedadores con nematodos melanizados, y se comparó entre los distintos tiempos de dormancia por medio de la prueba de Kruskal-Wallis. Para complementar este análisis se evaluó el efecto de la intensidad del parasitismo sobre la melanización de parásitos, seleccionando los datos del tiempo de dormancia con mayor cantidad de melanizados. Se analizó la relación entre la cantidad de parásitos melanizados

por hospedador y la intensidad del parasitismo por medio de una correlación lineal simple no paramétrica (Correlación de Spearman).

La proporción de larvas parasitadas muertas en cada estadio (mortalidad por estadio) se calculó como el número de individuos parasitados muertos en ese estadio, dividido el número de larvas parasitadas al inicio del mismo. Para cada estadio larval por separado se comparó la mortalidad entre tiempos de dormancia, usando un MLG con distribución binomial y función de enlace logit.

La proporción de individuos que alcanzaron el estado adulto, del total de individuos de cada tratamiento (supervivencia de *O. albifasciatus*), se analizó como variable dependiente en función del tiempo de dormancia de los huevos y de la exposición al parásito (variables independientes). Este análisis se realizó usando MLG, con distribución binomial y función de enlace logit.

Los intervalos de confianza calculados para las variables prevalencia del parasitismo y nematodos retenidos por hospedador, fueron obtenidos utilizando el método exacto mediante una calculadora en línea, en la página web: <http://www.sample-size.net/confidence-interval-proportion/>.

I. Resultados

Prevalencia e intensidad del parasitismo

La proporción de *O. albifasciatus* parasitados varió entre 0,20 y 0,47 para los distintos tiempos de dormancia. Se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos de 6 y 8 meses ($F = 7,64$; $n = 700$; g.l. = 4, 695; $p < 0,001$), sin que se observara un cambio unidireccional con el incremento del tiempo de dormancia de los huevos (Tabla 1).

La cantidad de nematodos encontrados en cada hospedador (intensidad del parasitismo) varió de 1 a 5, observándose menos de cuatro en el 94,3 % de los hospedadores. La intensidad más baja se registró en el tratamiento de 8 meses, donde el 83,3 % de los hospedadores fue parasitado por un nematodo y se observó un máximo de 3 parásitos por hospedador. La intensidad más alta se registró en el tratamiento de 6 meses, donde el 56,3 % de las larvas fue infectada por más de un parásito y el 11,3 % (8 individuos) por más de tres nematodos. Las intensidades de infección difirieron entre los tratamientos ($F = 6,59$; $n = 230$; g.l. = 4, 225; $p < 0,001$), si bien los de 6 y 8 meses, fueron las únicas que se diferenciaron entre sí (Tabla 1).

Tabla 1. Proporción de larvas parasitadas (intervalos de confianza), e intensidad (media \pm desvío estándar y rango) del parasitismo de *Strelkovimermis spiculatus*, en larvas de *Ochlerotatus albifasciatus* provenientes de huevos de diferentes tiempos de dormancia. Las letras iguales en la columna de prevalencia o en la columna de intensidad del parasitismo, indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos de infección ($p > 0,05$).

Tiempo de dormancia (meses)	Prevalencia del parasitismo (Intervalos de confianza)	Intensidad del parasitismo (rango)
2	0,23 (0,152-0,325) ^{cd}	1,3 \pm 0,71 ^{ab} (1-4)
4	0,33 (0,259-0,415) ^{bc}	1,5 \pm 0,79 ^{ab} (1-4)
6	0,47 (0,391-0,556) ^a	2,0 \pm 1,21 ^a (1-5)
8	0,20 (0,139-0,273) ^d	1,2 \pm 0,48 ^b (1-3)
10	0,38 (0,302-0,463) ^{ab}	1,7 \pm 0,91 ^{ab} (1-4)

Retención de nematodos

En todos los tratamientos se registraron hospedadores muertos con nematodos retenidos en su interior. La cantidad de parásitos retenidos por hospedador varió de 1 a 4, observándose diferencias significativas entre los tiempos de dormancia ($F = 4,77$; $n = 230$; g.l. = 4, 225; $p < 0,05$), pero sin evidenciar una tendencia clara entre ambas variables. Las cantidades de nematodos retenidos por hospedador en los tiempos de 2 y 6 meses, fueron elevadas y difirieron significativamente de lo observado en los demás tiempos. Los tiempos de 10 y 4 meses presentaron valores intermedios, y la cantidad de retenidos en el tiempo de 4 meses no difirió con el de 8, las cuales fueron bajas (Tabla 2).

Tabla 2. Proporción de parásitos retenidos (intervalos de confianza), para cada tratamiento de infección (tiempo de dormancia de los huevos). Las letras iguales indican tratamientos que no difieren significativamente entre sí ($p > 0,05$).

Tiempo de dormancia (meses)	Nematodos retenidos por hospedador
2	0,484 (0,302-0,669) ^a
4	0,250 (0,155-0,366) ^{bc}
6	0,413 (0,331-0,498) ^a
8	0,083 (0,018-0,225) ^c
10	0,270 (0,186-0,368) ^b

El promedio de nematodos retenidos por hospedador varió entre 0 y 4, siendo este último valor un evento poco frecuente, resultado de la retención de la totalidad de los parásitos en 4 hospedadores, 3 en el tratamiento de 10 meses y 1 en el de 2 meses (Tabla 3). El análisis de la proporción de retenidos como variable respuesta en función de la cantidad de nematodos mostró diferencias significativas entre los tiempos de dormancia solo para la intensidad de 1 nematodo por hospedador ($F = 2,87$; $n = 136$; g.l. = 4, 131; $p < 0,05$) observándose una tendencia a retenciones más altas en los tratamientos de menor tiempo de dormancia (Tabla 3).

Tabla 3. Proporción de parásitos retenidos por hospedador (intervalo de confianza y rango), para cada tratamiento de infección (tiempos de dormancia de los huevos), discriminados por el nivel de intensidad del parasitismo. Se indica la cantidad de hospedadores que presentaron cada intensidad de parasitismo. Las letras iguales indican tratamientos que no difieren significativamente entre sí ($p > 0,05$). * Intervalo de confianza unilateral de 97,5%.

Intensidad	Tiempo de dormancia (meses)	Cantidad de hospedadores	Proporción de nematodos retenidos por hospedador (Intervalos de confianza; rango)
1	2	17	0,41 (0,184-0,671; 1-1) ^{ab}
	4	34	0,38 (0,222-0,564; 1-1) ^{ab}
	6	31	0,48 (0,302-0,669; 1-1) ^a
	8	25	0,12 (0,025-0,312; 1-1) ^c
	10	29	0,17 (0,058-0,358; 1-1) ^{bc}
2	2	5	0,4 (0,122-0,738; 2-2)
	4	8	0,25 (0,073-0,524; 2-2)
	6	22	0,43 (0,283-0,590; 1-2)
	8	4	0 (0-0,369*)
	10	16	0,0031 (0,001-0,162; 1-1)
3	4	6	0,056 (0,001-0,273; 1-1)
	6	10	0,6 (0,406-0,773; 1-3)
	8	1	0 (0-0,708*)
	10	9	0,333 (0,165-0,540; 3-3)
4	2	1	1 (0,398*-1; 4-4)
	4	1	0 (0-0,602*)
	6	2	0,375 (0,085-0,755; 1-2)
	10	3	1 (0,735*-1; 4-4)
5	6	6	0,133 (0,038-0,307; 2-2)

Melanización de nematodos

La proporción de larvas parasitadas que presentaron nematodos melanizados fue considerablemente mayor en el tratamiento de 6 meses (0,34) que en los demás tratamientos. Las proporciones de larvas con parásitos melanizados de los tratamientos de 2, 4, 8 y 10 meses (0; 0,02; 0 y 0,04 respectivamente) no presentaron diferencias significativas entre sí ($H = 15,04$; $p > 0,001$).

La cantidad de nematodos melanizados por hospedador en el tratamiento de 6 meses (Tabla 4), no se relacionó con la intensidad del parasitismo ($n = 71$; $r = 0,11$; $p = 0,35$).

Tabla 4. Nematodos melanizados en el tratamiento de 6 meses en relación a la intensidad del parasitismo.

Intensidad del parasitismo	Larvas parasitadas	Cantidad de nematodos	Cantidad de nematodos melanizados	Promedio de nematodos melanizados por larva
1	31	31	10	0,32
2	22	44	12	0,54
3	10	30	14	1,4
4	2	8	0	0
5	6	30	2	0,33

Mortalidad de *Ochlerotatus albifasciatus* parasitados

La mortalidad por estadio en los individuos infectados fue mayor en el cuarto estadio de desarrollo y menor en el segundo estadio y en el estado de pupa, en todos los tratamientos (Tabla 5). La mortalidad del segundo estadio no difirió significativamente entre los tiempos de dormancia ($p > 0,05$), observándose solo dos muertes en todo el experimento (tratamientos de 4 y 6 meses). La mortalidad del tercer estadio, presentó diferencias significativas entre los tiempos de dormancia ($F = 2,55$; $n = 230$; g.l. = 4, 225; $p < 0,05$), siendo mayor en el tiempo de 4 meses, que en aquellos de 10, 8 y 2 meses, mientras que en el tratamiento de 6 meses fue intermedia y no difirió significativamente de la registrada en los tratamientos anteriores. La mortalidad de las larvas infectadas del último estadio larval, varió entre los tiempos de dormancia ($F = 2,66$; $n = 230$; g.l. = 4, 225; $p < 0,05$), registrándose un mayor valor en los tratamientos de 2, 8 y 10 meses que en el tratamiento de 4 meses. La mortalidad de los individuos del tiempo de 6 meses fue intermedia, y no se diferenció de la registrada en los demás tiempos. En el tratamiento de 2 meses se observó el único individuo de *O. albifasciatus*

parasitado del experimento que alcanzó el estado de pupa y murió reteniendo el parásito en su interior.

Tabla 5. Proporción por estadio (L), de *Ochlerotatus albifasciatus* parasitados y muertos, del total de individuos parasitados en cada tratamiento. Las letras iguales indican tratamientos que no difieren significativamente entre sí ($p > 0,05$).

Tiempo de dormancia	Estadio larval			
	L2	L3	L4	P
2	0,00 ^a	0,13 ^b	0,83 ^a	0,04 ^a
4	0,02 ^a	0,41 ^a	0,57 ^b	0,00 ^a
6	0,01 ^a	0,30 ^{ab}	0,69 ^{ab}	0,00 ^a
8	0,00 ^a	0,17 ^b	0,83 ^a	0,00 ^a
10	0,00 ^a	0,19 ^b	0,81 ^a	0,00 ^a

Supervivencia de *Ochlerotatus albifasciatus* no parasitados

Las proporciones de individuos de *O. albifasciatus* no expuestos al nematodo (C = grupo control) y aquellos expuestos no parasitados (EnP) que sobrevivieron hasta el estado adulto fueron bajas en todo el experimento (menores que 0,30), a excepción de la registrada para el control del tratamiento con huevos de 4 meses de dormancia (Fig. 3). La supervivencia de los individuos varió de acuerdo a si fueron expuestos al parásito ($F = 4,97$; $n = 1118$; g.l. = 1, 1108; $p < 0,05$), en relación al tiempo de dormancia de los huevos ($F = 12,68$; $n = 1118$; g.l. = 4, 1108; $p < 0,001$) y con la interacción de ambas variables ($F = 15,81$; $n = 1118$; g.l. = 4, 1108; $p < 0,001$). La supervivencia del control disminuyó con el aumento del tiempo de dormancia a partir del tratamiento de 4 meses, registrándose las medias más bajas en los tiempos de 8 y 10 meses. En cambio en los individuos EnP ($n = 470$), la variación de la supervivencia no presentó una tendencia clara en relación a los diferentes tiempos.

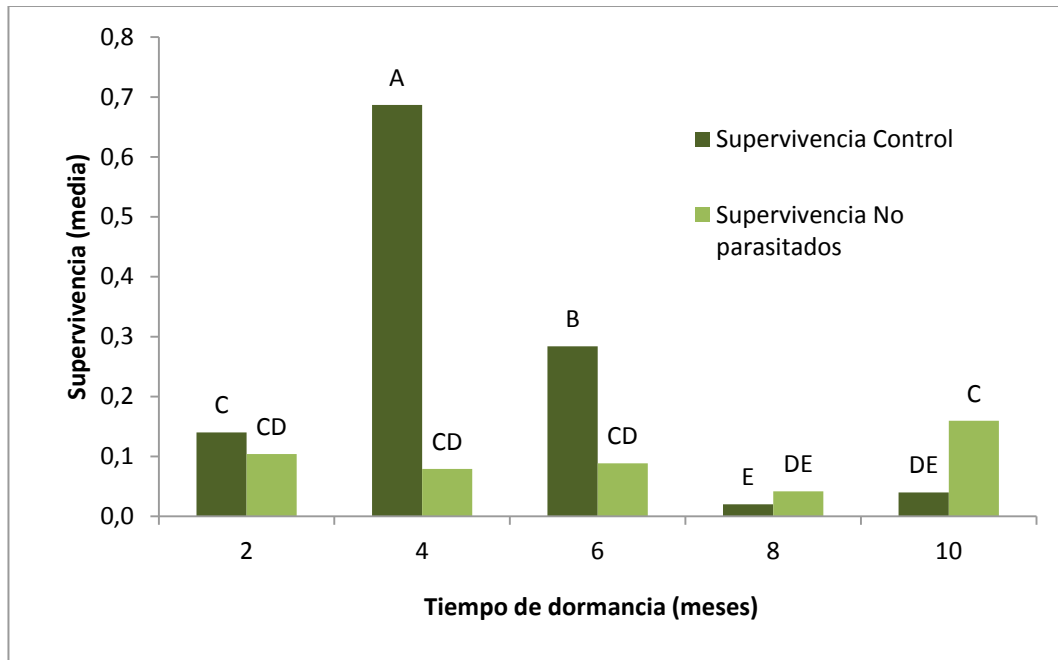


Figura 3. Supervivencia de larvas de *Ochlerotatus albifasciatus* del grupo control (barras de color gris claro) y de aquellas expuestas a *Strelkovimermis spiculatus* que evitaron la infección (barras de color gris oscuro), en cada tiempo de dormancia. Las letras iguales indican tratamientos que no difieren significativamente entre sí ($p > 0,05$).

I. Discusión

Muchos estudios en condiciones de laboratorio enfocados en el parasitismo de *S. spiculatus* se han realizado sobre hospedadores alternativos, es decir, especies de mosquitos a las cuales el nematodo es capaz de parasitar y desarrollarse, pero que no son las que participan de infecciones con altas prevalencias en condiciones naturales (Achinelly y Micieli, 2013). En estos estudios las prevalencias del parasitismo reportadas en laboratorio son relativamente altas y varían dependiendo de la especie de hospedador y la relación numérica entre las formas infectantes y las larvas del mosquito. Para *A. aegypti* por ejemplo, en infecciones de larvas expuestas de forma grupal (n = 100 individuos) al nematodo con una relación parásito/hospedador de 5:1, se reportaron prevalencias de 55,6 % (Becnel y Johnson, 1998), 70 % (Pérez Pacheco *et al.*, 2015), y con una relación de 10:1, 94 % (Achinelly y Micieli, 2010). En *Ochlerotatus sierrensis* Ludlow expuestos de forma grupal (n = 100) en bandejas con relaciones parásito-hospedador de 5:1 y 10:1, se reportaron entre 55,5 y 70 % de infección respectivamente (Pérez Pacheco *et al.*, 2015). En *Culex pipiens*, la prevalencia de parasitismo en infecciones en condiciones similares fueron de 88 % (Becnel y Johnson, 1998) y 100 % (Pérez Pacheco *et al.*, 2015). En infecciones individuales, donde se colocó una larva del hospedador en un volumen reducido de agua (2 ml), la prevalencia de infección en *A. aegypti* osciló entre 39,4 %, utilizando una relación parásito/hospedador de 1:1, y 90 % con una relación 5:1 (Pérez Pacheco *et al.*, 2015). En infecciones con *C. pipiens* (5:1, parásito-hospedador), los mismos autores reportaron una prevalencia de 90 %.

La baja proporción de larvas parasitadas en el presente estudio (0,20 a 0,47), comparada con estos trabajos, podría estar relacionada con la metodología empleada al momento de la infección y con la utilización del hospedador natural del nematodo, *O. albifasciatus*. Algunos autores han indicado que el encuentro entre *S. spiculatus* y su hospedador, depende de la cantidad de larvas en el ambiente y las señales químicas que estas producen (Dong *et al.*, 2017, Wang *et al.*, 2012). La alta disponibilidad de hospedadores en los ambientes temporarios de *S. spiculatus*, facilita la búsqueda e infección de las larvas de mosquitos, lo cual se ve reflejado en la menor capacidad de búsqueda de amplio rango del parásito, comparada con la de otros mermitidos (Dong *et al.*, 2017). De esta manera, la metodología utilizada en el presente ensayo, donde se expuso un

solo hospedador, introducido al recipiente una hora después de haber colocado las formas infectantes, posiblemente no generó el suficiente estímulo para estas últimas, y esto podría ser la causa de la baja proporción de larvas parasitadas en el experimento. Por otro lado, se esperaría que *O. albifasciatus*, el hospedador natural de *S. spiculatus*, haya adquirido evolutivamente más estrategias para evitar la infección que los hospedadores alternativos, producto de presiones selectivas más fuertes que las que actúan sobre estos últimos. Hasta el momento no se conocen estudios donde se compare la tasa de infección entre hospedadores naturales y alternativos, pero un mecanismo de este tipo se puede observar para la interacción predador-presa en mosquitos, donde una presa que naturalmente coexiste con el predador tiene mejor estrategia de escape de este, que una presa que no tiene una historia evolutiva con el predador (Sih, 1986; Kesavaraju y Juliano, 2004).

Los estudios de campo enfocados en la dinámica poblacional de *S. spiculatus* y *O. albifasciatus*, muestran que existe una gran variabilidad de la intensidad y de la prevalencia de las infecciones a lo largo del tiempo y entre diferentes sitios de cría en una misma región (Campos y Sy, 2003; Micieli *et al.*, 2012). Micieli *et al.* (2012), luego de analizar variables bióticas y abióticas relacionadas a poblaciones naturales de *O. albifasciatus* parasitadas con *S. spiculatus* en tres ambientes, no pudieron explicar las diferencias observadas entre los niveles de parasitismo de los distintos hábitats evaluados, si bien sugirieron que las variaciones físicas de los sitios, las características químicas del agua en cada ambiente o la abundancia del hospedador podrían estar involucrados. En este estudio, se planteó la hipótesis de que los diferentes tiempos de dormancia de los huevos y el estado consecuente de las larvas de *O. albifasciatus* que provienen de estos, pueden influir en la prevalencia e intensidad del parasitismo producido por *S. spiculatus*. Según los resultados obtenidos, existe una gran variabilidad en el parasitismo en larvas provenientes de huevos con distintos tiempo de dormancia pero no se puede atribuir esa variación unívocamente al tiempo transcurrido. Es decir que las larvas provenientes de huevos con tiempos prolongados de dormancia no necesariamente serían parasitadas en mayor proporción o con mayor intensidad que aquellas de tiempos relativamente más cortos. Esto sugiere que otros factores como las condiciones físicas del ambiente o la abundancia de las formas infectantes, podrían ser más determinantes en la variabilidad observada en las infecciones naturales. En este sistema parásito-hospedador, las

infecciones con más de un nematodo por larva son frecuentes (Micieli y García, 1999; Micieli *et al.*, 2012; Di Battista *et al.*, 2015). Micieli y García (1999) estudiaron cinco cohortes de *O. albifasciatus*, y hallaron una media de 5,5 parásitos por larva de mosquito en una de ellas. Sin embargo, se conoce que un aumento en la intensidad del parasitismo provoca un incremento en la mortalidad del parásito (Camino, 1988; Santamarina Mijares y Pérez Pacheco, 1998). Por ejemplo, un estudio sobre el parasitismo de *S. spiculatus* en *Culex pipiens pipiens* Linnaeus, muestra que el aumento de la cantidad de nematodos por hospedador de uno a cinco, provoca una reducción de la supervivencia del parásito en la fase parasítica de más del 50 % (Sanad *et al.*, 2017). En un estudio previo sobre una cohorte natural de larvas de *O. albifasciatus* parasitadas por *S. spiculatus*, se reportó que la mortalidad del nematodo en la fase parasítica aumentó considerablemente cuando se incrementó a más de 8 la cantidad de parásitos por larva (Di Battista *et al.*, 2015). En el presente trabajo, a pesar de que no se evaluó la mortalidad del parásito en la fase parasítica, se registró que las retenciones de estos no variaron con el aumento de la intensidad del parasitismo. Esto probablemente se deba a que la intensidad máxima posible en el experimento, cinco parásitos por hospedador, estuvo determinada por la relación parásito-hospedador utilizada. Es probable que si existe un efecto de la intensidad del parasitismo de *S. spiculatus* en la retención de nematodos por parte de *O. albifasciatus*, este se visualice en infecciones con intensidades más altas que cinco parásitos por larva. Cabe destacar que la mayoría de los parásitos retenidos dentro de las larvas de *O. albifasciatus* (Anexo, Fig. 4) no presentaron signos de melanización, por lo cual no podemos afirmar cual fue la causa de estas retenciones.

La melanización de diferentes patógenos en artrópodos, y en particular en mosquitos, ha sido ampliamente estudiada (ej. Christensen *et al.*, 2005; Tang, 2009; Yassine *et al.*, 2012; Barreaux *et al.*, 2016) y se conoce que la eficacia de este proceso está influenciada por la patogenicidad del parásito (Ferdig *et al.*, 1993), la intensidad de la infección (Barreaux *et al.*, 2016), y la edad (Hillyer *et al.*, 2005) y estado nutricional del hospedador (Koella y Sorensen, 2002). En el presente estudio, la melanización del nematodo (Anexo, Fig. 5) no varió siguiendo un patrón en relación al aumento de los tiempos de dormancia o al aumento de la intensidad del parasitismo. Los resultados observados sugieren que la melanización no difiere entre individuos provenientes de huevos “jóvenes” o de huevos “viejos”, o entre infecciones de alta o baja intensidad. Teniendo en

cuenta lo observado, no se puede inferir qué factores se relacionan a la ocurrencia o ausencia de esta reacción.

Pérez y Noriega (2012) observaron una disminución de la supervivencia de larvas de *A. aegypti*, cuando el período de dormancia de los huevos aumentó de menos de una semana a más de dos meses. De forma similar, en el presente estudio se observó una disminución de la supervivencia de *O. albifasciatus* que se relacionó con el aumento de los tiempos de dormancia a partir de los cuatro meses. En contraposición a esta tendencia, en el período de dos meses se registró una supervivencia baja y similar a la de diez meses, de la cual se desconocen sus causas.

Un resultado particular observado en los individuos que transcurrieron un período de dormancia de diez meses, fue que aquellos expuestos al nematodo que escaparon de la infección presentaron una supervivencia mayor que las larvas no expuestas a las formas infectantes del parásito. En cambio en los tiempos menores a diez meses la supervivencia de los expuestos fue similar o menor a la supervivencia del control. Se desconoce cómo la exposición a las formas infectantes del parásito se relacionó con el aumento de la supervivencia de las larvas provenientes de los huevos longevos. No podemos asegurar que esto no tenga relación con la variabilidad que se registró para esta especie en todos los factores analizados.

Teniendo en cuenta la enorme variabilidad observada en este trabajo, es difícil inferir sobre la relación parásito-hospedador que se establece entre *S. spiculatus* y *O. albifasciatus* en condiciones naturales. A pesar de esto, según los resultados obtenidos, se puede indicar que no se obtuvo evidencia que sustente la idea de que los tiempos de dormancia crecientes afecten la susceptibilidad al parasitismo, o la supervivencia de las larvas expuestas o no a las formas infectantes del nematodo.

CAPÍTULO II

**Evaluación del parasitismo producido por
Strelkovimermis spiculatus en larvas de *Ochlerotatus
albifasciatus* variando la relación parásito/hospedador y la
altura de la columna de agua**

II. Introducción

Distintos estudios mostraron que los niveles de infección pueden variar con el tiempo y entre los distintos charcos de una misma región (Achinelly y Micieli, 2013), lo cual se puede asociar a la variación de factores abióticos como la superficie del área inundada (Micieli *et al.*, 2012). La variación en las dimensiones del ambiente acuático, probablemente afecte la probabilidad de encuentro entre el parásito y las larvas del mosquito, sobre todo para *S. spiculatus*, ya que presenta un comportamiento de búsqueda del hospedador más pasivo que otros nematodos parásitos, respondiendo solo cuando el hospedador se encuentra cerca (Dong *et al.*, 2017). Esta estrategia es menos eficaz si la superficie o la profundidad del cuerpo de agua aumentan, ya que disminuye la probabilidad de contacto entre ambas especies.

Por otro lado, los cambios de las dimensiones del cuerpo de agua y de la abundancia relativa de ambas especies, podrían ser factores claves en la interacción parásito hospedador, si tenemos en cuenta que la misma se produce en el borde de los ambientes acuáticos (Micieli y García, 1999), los cuales pueden presentar una heterogeneidad más acentuada que la del centro de los mismos. La mayoría de los estudios realizados, se enfocaron en la evaluación de la infectividad del nematodo utilizando diferentes dosis de formas infectantes por larva de mosquitos, y no analizaron en detalle los efectos de las dimensiones del cuerpo de agua donde ocurre la infección. Teniendo en cuenta esto y conociendo que los ambientes naturales donde coexisten estas especies sufren cambios drásticos del nivel de agua, se evaluó en condiciones de laboratorio, la prevalencia e intensidad del parasitismo de *S. spiculatus* en *O. albifasciatus* variando la altura de la columna de agua y la relación parásito-hospedador.

II. Materiales y Métodos

Diseño experimental y procedimientos

Se realizaron dos experimentos de cuatro tratamientos cada uno, donde se expusieron las larvas de *O. albifasciatus* a las formas infectantes del nematodo. En el primer experimento, las infecciones se llevaron a cabo manteniendo una relación parásito-hospedador constante de 5:1 en todos los tratamientos y variando la altura de la columna de agua del recipiente, la cual fue de 5, 10, 15 y 20 cm. En el segundo experimento, se varió la relación parásito-hospedador en función de la altura de la columna de agua fijando una relación diferente para cada altura. Las relaciones utilizadas fueron de 15:1, 30:1, 45:1 y 60:1 para los tratamientos de 5, 10, 15 y 20 cm respectivamente.

Antes de iniciar los ensayos, los huevos de *O. albifasciatus* se colocaron en una cápsula de Petri y fueron sumergidos durante 24 horas en 40 ml de agua declorinada, con el agregado de 10 mg de alimento para peces como estimulante de eclosión. Luego del nacimiento, las larvas fueron distribuidas en grupos de 10 individuos y colocadas en bandejas con 600 ml de agua para evitar el hacinamiento. Se les proveyó como alimento una solución de 0,25 mg de alimento balanceado para conejo tamizado y molido por ml de agua. Los ensayos se realizaron en una habitación con condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo, a 23 °C y 12:12 horas (L: O) respectivamente, simulando las condiciones de fin del verano de la ciudad de La Plata.

Las infecciones se llevaron a cabo en recipientes cilíndricos de 3 cm de diámetro y 25 cm de altura, conteniendo agua declorada y alimento balanceado para conejos molido y tamizado (Fig. 1). Se realizaron veinte replicas por tratamiento en cada uno de los experimentos (80 replicas por experimento), utilizando larvas del segundo estadio de desarrollo de *O. albifasciatus* (L2) y formas infectantes (J2) de *S. spiculatus*. Las J2 del nematodo y las larvas del mosquito fueron colocadas 24 horas después del agregado del agua y el alimento en los recipientes. Luego de 24 horas de exposición al parásito las larvas de mosquito de ambos experimentos se trasvasaron de forma individual a recipientes con 200 ml de agua agregando como fuente nutritiva 10 mg de alimento para conejos. Los experimentos finalizaron cuando todos los individuos murieron o alcanzaron el estado adulto (diez y once días, desde la eclosión del

huevo hasta la muerte de la última larva, en el primer y segundo experimento respectivamente), momento en el cual se verificó por disección la presencia/ausencia de nematodos.



Figura 1. Recipientes utilizados en los dos experimentos donde se realizaron infecciones de *Ochlerotatus albifasciatus* con *Strelkovimermis spiculatus*, en columnas de agua de diferentes alturas.

Para ambos experimentos se procedió de la siguiente manera: Para cada tratamiento se cuantificó: (1) número de larvas parasitadas, (2) mortalidad causada por otros factores (individuos que murieron y no presentaron parasitismo). Para cada individuo se registró: (1) presencia/ausencia del parásito (2) cantidad de parásitos por larva y (3) cantidad de postparasitos (nematodos que completan su desarrollo parasítico y emergen) por hospedador.

Análisis de los datos

El efecto de la altura de la columna de agua y de la relación parásito-hospedador (J2-L2), sobre la proporción de larvas parasitadas (prevalencia del parasitismo), fue analizado mediante Modelos Lineales Generalizados (MLG) y las medias de los tratamientos fueron comparadas mediante la prueba LSD Fisher. La proporción de larvas de *O. albifasciatus* parasitadas por *S. spiculatus* en cada tratamiento se calculó como el número de individuos infectados al final de cada experimento, dividido el número de individuos al inicio del mismo. Esta

variable se analizó como variable dependiente en ambos experimentos, y se comparó entre las diferentes alturas de las columnas de agua (variable independiente del primer experimento) y entre las diferentes relaciones parásito-hospedador (variable independiente del segundo experimento) usando una distribución binomial con función de enlace logit. Esta última es adecuada para ensayos independientes (exposición de cada larva de mosquito a las formas infectantes) con la misma probabilidad de éxito (larva infectada) entre sí.

Las relaciones entre la intensidad del parasitismo (cantidad de parásitos encontrados por hospedador) y la altura de la columna de agua (experimento 1), y la intensidad del parasitismo y la relación J2-L2 (experimento 2), se analizaron por medio del coeficiente de correlación de Spearman (r_s), adecuado para datos no paramétricos. Además se calculó el porcentaje de hospedadores que presentaron las intensidades de uno, dos, tres y más de tres nematodos en su interior, en relación al total de hospedadores del experimento.

La proporción de nematodos emergidos (postparásitos) por hospedador, se calculó como el número de juveniles postparásitos que emergieron, dividido el número de parásitos totales (emergidos y retenidos) de cada hospedador. Esta variable se analizó como variable dependiente y se comparó entre los tratamientos por medio de un MLG con distribución binomial y función de enlace logit.

La proporción de larvas de *Ochlerotatus albifasciatus* no parasitadas muertas por tratamiento, se calculó como la cantidad de individuos que murieron antes de alcanzar el estado adulto, dividido la cantidad de individuos no parasitados. Esta variable se analizó como variable dependiente y se comparó entre los tratamientos por medio de MLG con distribución binomial y función de enlace logit. Además, para el segundo experimento donde se varió la relación J2-L2, se calculó el porcentaje de larvas muertas durante el segundo, tercero y cuarto estadio larval. Esto se llevó a cabo con el fin de determinar si el uso de una cantidad relativamente alta de formas infectantes durante la infección, se puede asociar a un aumento de la mortalidad del hospedador antes del cuarto estadio de desarrollo.

Los análisis se llevaron a cabo utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2017, vinculado a R mediante DCOM en los análisis que así lo requerían (Di Rienzo, *et al.*, 2017).

II. Resultados

Experimento 1: Infecciones variando la altura de la columna de agua

Prevalencia e intensidad del parasitismo

La proporción de *O. albifasciatus* parasitados varió entre 0,15 en las columnas de agua de 15 cm de alto, y 0,55 en aquellas de 5 cm de alto (Tabla 1). El MLG no mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($F = 2,45$; $n = 80$; g.l. = 3, 76; $p = 0,07$).

La cantidad de nematodos encontrados en cada hospedador (intensidad del parasitismo) varió entre 1 y 5 (Tabla 1), y no se relacionó con la altura de la columna de agua ($r_s = -0,32$; g.l. = 25; $p = 0,11$). El 57,7 % ($n = 15$) de los hospedadores presentaron un nematodo, el 19,2 % ($n = 5$) dos, el 11,5 % ($n = 3$) tres nematodos y el 11,5 % ($n = 3$) cuatro y cinco nematodos en su interior.

Tabla 1. Proporción de larvas parasitadas (intervalos de confianza) e intensidad (media \pm desvío estándar y rango) del parasitismo de *Strelkovimermis spiculatus* en larvas de *Ochlerotatus albifasciatus*, en columnas de agua de diferentes alturas.

Tratamiento (altura en cm)	Prevalencia (intervalos de confianza)	Intensidad (rango)
5	0,55 (0,315-0,769)	2,54 \pm 1,44 (1-5)
10	0,25 (0,087-0,491)	1 (1-1)
15	0,15 (0,032-0,379)	1 (1-1)
20	0,35 (0,154-0,592)	1,57 \pm 0,53 (1-2)

Postparásitos de *Strelkovimermis spiculatus* emergidos

La proporción de postparásitos emergidos en cada hospedador varió entre 0,67 y 0,89 (Tabla 2), y no mostró diferencias entre los tratamientos ($F = 1,16$; $n = 26$; g.l. = 3, 22; $p = 0,34$).

Tabla 2. Proporción de postparásitos emergidos (intervalos de confianza) del total de parásitos de cada tratamiento (altura de la columna de agua).

Tratamiento (altura en cm)	Postparásitos emergidos/total de parásitos (Intervalos de confianza)
5	0,89 (0,718-0,977)
10	0,80 (0,284-0,995)
15	0,67 (0,094-0,992)
20	0,82 (0,482-0,977)

Mortalidad de *Ochlerotatus albifasciatus*

Todos los individuos parasitados (n = 26) por *S. spiculatus* murieron en el estado larval, principalmente en el estadio IV (n = 25).

La proporción de larvas muertas no parasitadas varió en función de la altura de la columna de agua (F = 3,94; n = 54; g.l. = 3, 50; p = 0,013), observándose diferencias entre los tratamientos de 10 y 15 cm (0,20 y 0,88 respectivamente) (Tabla 3).

Tabla 3. Proporción de larvas no parasitadas muertas (media e intervalos de confianza) del total de larvas no parasitadas por tratamiento. Las letras iguales indican tratamientos que no difieren significativamente entre sí (p > 0,05).

Tratamiento (altura en cm)	Proporción de larvas no parasitadas muertas (Intervalos de confianza)
5	0,56 (0,212-0,863) ^{ab}
10	0,20 (0,043-0,481) ^a
15	0,88 (0,636-0,985) ^b
20	0,54 (0,251-0,808) ^{ab}

Experimento 2: Infecciones variando la relación parásito-hospedador en función de la altura de la columna de agua

Prevalencia e intensidad del parasitismo

La proporción de *O. albifasciatus* parasitados varió entre 0,55 en el tratamiento con relación parásito-hospedador (J2/L2) de 30:1 y 0,85 en el tratamiento con relación 60:1 (Tabla 4). El MLG no mostró diferencias significativas en función de las relaciones J2/L2 utilizadas ($F = 1,36$; $n = 80$; g.l.: 3, 76; $p = 0,26$).

La cantidad de nematodos por hospedador no se asoció a la relación J2/L2 utilizada en cada tratamiento ($r_s = -0,12$; g.l.: 54; $p = 0,37$). El rango de nematodos por hospedador observado en el experimento fue de 1 a 9 y el promedio varió entre 2,27 en el tratamiento de relación 30:1, y 4,15 en el tratamiento de relación 15:1 (Tabla 4). El 23,6 % ($n = 13$) de las larvas parasitadas presentó un parásito en su interior, el 21,8 % ($n = 12$) estuvo parasitada por dos nematodos, el 20 % ($n = 11$) por tres y el resto, 34,5 % ($n = 19$) presentó desde cuatro hasta nueve nematodos.

Tabla 4. Proporción de larvas parasitadas (intervalos de confianza) e intensidad (media \pm desvío estándar, rango) del parasitismo en cada tratamiento.

Relación J2/L2	Altura (cm)	Prevalencia (Intervalos de confianza)	Intensidad (rango)
15:1	5	0,65 (0,408-0,846)	4,15 \pm 1,82 (1-8)
30:1	10	0,55 (0,315-0,769)	2,27 \pm 1,79 (1-7)
45:1	15	0,70 (0,457-0,881)	2,86 \pm 1,56 (1-6)
60:1	20	0,85 (0,621-0,968)	3,47 \pm 2,65 (1-9)

Postparásitos de *Strelkovimermis spiculatus* emergidos en cada tratamiento

La proporción de postparásitos emergidos del total de nematodos que parasitaron cada larva de *O. albifasciatus*, presentó valores altos en todos los tratamientos (Tabla 5). El análisis con MLG no reveló diferencias significativas del número de postparásitos emergidos por hospedador entre los tratamientos ($F = 0,40$; $n = 55$; g.l. = 3, 51; $p = 0,75$).

Tabla 5. Proporción de postparásitos emergidos (intervalos de confianza) del total de parásitos en cada tratamiento de infección.

Tratamiento (relación J2/L2)	Postparásitos emergidos/total de parásitos (Intervalos de confianza)
15:1	0,96 (0,873-0,995)
30:1	1,00 (0,863-1)
45:1	1,00 (0,912-1)
60:1	0,83 (0,653-0,877)

Mortalidad de *Ochlerotatus albifasciatus*

Todos los individuos parasitados ($n = 55$) por *S. spiculatus*, murieron en el cuarto estadio larval.

La proporción de larvas no parasitadas que murieron varió desde 0,78 hasta 1 (Tabla 6), y no presentó diferencias significativas en función de los distintos tratamientos ($F = 0,06$; $n = 25$; g.l. = 3, 21; $p = 0,98$). En los tratamientos con relación J2/L2 de 15:1, 30:1 y 60:1, la mortalidad de larvas no parasitadas se concentró en el cuarto estadio (0,7; 0,7 y 1 respectivamente), mientras que en el tratamiento de 45:1, la mortalidad fue mayor en el tercer estadio larval (0,6).

Tabla 6. Proporción de larvas no parasitadas muertas (media e intervalos de confianza) del total de larvas no parasitadas por tratamiento.

Tratamiento	Proporción de larvas no parasitadas muertas (Intervalos de confianza)
15:1	0,86 (0,421-0,996)
30:1	0,78 (0,400-0,972)
45:1	0,83 (0,359-0,996)
60:1	1,00 (0,292-1)

II. Discusión

La prevalencia e intensidad del parasitismo en larvas de *O. albifasciatus* expuestas a *S. spiculatus* registradas en el presente estudio, demuestran la capacidad del nematodo para encontrar y parasitar a su hospedador natural al menos dentro del rango evaluado. Esta capacidad resulta necesaria para que la interacción parásito-hospedador se mantenga a través de los ciclos de inundación y sequía que ocurren en condiciones naturales, donde la profundidad de los cuerpos de agua y las abundancias relativas de ambas especies, cambian a lo largo del tiempo. A pesar de que el efecto de la altura de la columna de agua sobre el parasitismo producido por *S. spiculatus* no se ha evaluado con anterioridad, se reportó una correlación positiva entre el área inundada en los ambientes naturales de cría de *O. albifasciatus* y la prevalencia de infección de *S. spiculatus*, en la región templada de Argentina (Micieli *et al.*, 2012). Estos autores sugirieron que dicha correlación podría deberse a la eclosión de huevos del parásito que permanecieron viables pero sin eclosionar durante varios meses. Este patrón observado en la naturaleza, que incluye un incremento de las precipitaciones, seguida de un aumento en la abundancia de *O. albifasciatus* y un incremento en la prevalencia de infección, podría sugerir que el cambio en las abundancias relativas de los organismos o en la altura de la columna de agua afecta el parasitismo. Sin embargo, este último aspecto no se evidenció en el presente estudio en condiciones de laboratorio.

Los resultados de este estudio sugieren que la habilidad de las formas infectantes de *S. spiculatus* para encontrar y parasitar a larvas de *O. albifasciatus* no se alteraría por la variación en la profundidad de los cuerpos de agua ni por la relación parásito-hospedador existente al momento de la infección, al menos con las escalas evaluadas. Es probable que en la naturaleza las abundancias relativas de ambas especies varíen en orden de magnitud (Micieli y García, 1999) al igual que las densidades de ambos en el ambiente acuático. Considerando esto, sería conveniente realizar futuros estudios contemplando rangos más amplios de relaciones J2/L2 y densidades.

CAPÍTULO III

Alteración del comportamiento en larvas de *Ochlerotatus albifasciatus* parasitadas por *Strelkovimermis spiculatus*, provenientes de huevos con diferentes periodos de dormancia

III. Introducción

Los parásitos pueden alterar el comportamiento de sus hospedadores para favorecer su dispersión o supervivencia mediante diversos mecanismos, los cuales en muchos casos son difíciles de determinar. Estas modificaciones pueden ser el resultado, entre otras, de la atrofia muscular producida por el parásito, la atrofia de órganos sensoriales, la invasión del parásito en el sistema nervioso central del hospedador, la secreción de neurotransmisores, o la reacción del sistema inmune del hospedador que provoca cambios en su sistema nervioso y en su comportamiento (Thomas *et al.*, 2005). La alteración del comportamiento del hospedador suele ser común cuando los parásitos presentan ciclos de vida complejos, donde el comportamiento del hospedador intermediario puede influir en el encuentro entre el parásito y su hospedador definitivo. Un ejemplo de esto es el parasitismo en cucarachas producido por acantocéfalos, donde la mayor frecuencia de utilización por parte de los individuos parasitados, de sustratos horizontales que verticales, puede relacionarse a un aumento de la depredación por el hospedador definitivo del parásito (p. ej. roedores) (Silverman y Bell, 1979; Gotelli y Moore, 1992). En los mosquitos, este fenómeno fue sugerido en el ciclo de transmisión del paludismo, donde el estadio esporozoito de *Plasmodium gallinaceum* Brumpt (Haemosporida: Plasmodiidae) disminuye la cantidad de sangre ingerida por el mosquito por unidad de tiempo. Esta alteración, producida solo por el estado infectivo del parásito, aumenta el tiempo necesario para que la hembra logre una comida de sangre completa, incrementando las posibilidades de que sea interrumpida antes de que esto suceda. Cuando esto último ocurre, la hembra debe picar reiteradas veces para completar su alimentación, lo cual aumenta la transmisión del parásito (Koella *et al.*, 2002). En el ciclo de transmisión de filarias, los mosquitos actúan como hospedadores intermediarios, y en estos también se reportaron alteraciones del comportamiento. Los mosquitos infectados con filarias del primero y segundo estadio disminuyen la reacción de vuelo hacia su fuente de alimento, mientras que luego de que las filarias dentro del mosquito pasan al tercer estadio (infectivo), la reacción de vuelo hacia la fuente de alimento (hospedador definitivo de la filaria) aumenta cinco veces (Gleave *et al.*, 2016).

Para el caso de los parasitoides, los cuales infectan solo un hospedador y este muere luego de la interacción, también se han reportado alteraciones del

comportamiento en el hospedador que benefician al parásito. Los casos más estudiados son los referidos a insectos que durante sus estadios larvales parasitan otros insectos. Por ejemplo los abejorros *Bombus terrestris* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae) parasitados por dípteros de la familia Conopidae, a diferencia de sus pares no parasitados, se entierran antes de morir, lo cual le proporciona al parasitoide un sitio seguro para empupar e hibernar. Si el abejorro parasitado no se entierra, las pupas de Conopidae hibernan en la superficie del suelo, corriendo mayores riesgos de sufrir malformaciones en las alas (Müller y Zürich, 1994). Las larvas de la mariposa *Euphydryas phaeton* (Drury) (Lepidoptera: Nymphalidae) parasitadas por *Apanteles euphydryidis* Muesebeck (Hymenoptera: Braconidae) abandonan su comportamiento gregario característico, beneficiando al parasitoide al reducir la depredación, el hiperparasitismo e incrementar la eficiencia de la ubicación de la pareja (Stamp, 1981). Otras alteraciones del comportamiento de insectos producidas por parásitos pueden tener efectos benéficos tanto para el parásito como para el hospedador. El parasitoide *Thelaira americana* Brooks (Diptera: Tachinidae) modifica la elección de alimento por parte de su hospedador, la oruga de *Platyprepia virginialis* Boisduval (Lepidoptera: Eribidae), resultando en un aumento de la supervivencia del hospedador y del parásito (Karbon y English-Loeb, 1997).

En los parasitismos producidos por nematodos Mermithidae parasitoides de artrópodos, también se han descrito alteraciones del comportamiento del hospedador. Por ejemplo las ninfas *Baetis bicaudatus* Dodds (Ephemeroptera: Baetidae) parasitadas por *Gasteromermis* sp. (Nematoda: Mermithidae) derivan menos que sus pares no parasitadas, lo cual disminuye la eficacia de búsqueda de alimento y el riesgo de depredación. Según las observaciones del autor, la localización de comida sería menos importante para el parásito que el riesgo a ser depredado (Vance, 1996). En otro estudio se observó que las ninfas de efemeróptera parasitadas por nematodos Mermithidae presentaron un aumento de la actividad en relación a sus pares no parasitadas. El incremento de la distancia recorrida por la ninfa, fue relacionado con un incremento en la búsqueda de alimento a causa del déficit de nutrición causado por el parásito (Benton y Pritchard, 1990). En ese mismo estudio también se evaluó el comportamiento de los individuos parasitados, frente a depredadores, encontrándose que estos disminuyeron la distancia recorrida en relación a los individuos parasitados no expuestos a depredadores, pero la aumentaron en

relación al grupo control (no parasitados). Esto hizo suponer que el estímulo al aumento de la actividad (probablemente la búsqueda de alimento) fue más fuerte al estímulo de la disminución de actividad (presencia del depredador).

En los estudios del parasitismo de mermitidos en *A. aegypti*, Wise de Valdez (2006) mostró que las larvas parasitadas por *S. spiculatus* o *R. culicivorax*, presentaron alteraciones que incluyeron el incremento de los comportamientos de alimentación en larvas de estadios tempranos del desarrollo y la disminución de la actividad en larvas de cuarto estadio comparadas con aquellas no parasitadas. El incremento en la alimentación en larvas fue relacionado por la autora como una adaptación del parásito para incrementar la adquisición nutricional y asegurar de esta manera el desarrollo completo del nematodo. En cambio la disminución de la actividad de los últimos estadios larvales, podría relacionarse a una adaptación del parásito para reducir el riesgo de depredación. Sin embargo en un estudio posterior la misma autora evaluó el comportamiento de larvas de *A. aegypti* parasitadas y no parasitadas por *R. culicivorax*, en relación al depredador *Toxorhynchites rutilus rutilus* (Coquillett) (Diptera: Culicidae), y no encontró una diferencia significativa, concluyendo que en ese sistema no existe una adaptación del parasitoide para aumentar su supervivencia (Wise de Valdez, 2007).

La dinámica del sistema parásito-hospedador que se establece entre *S. spiculatus* y *O. albifasciatus* está determinada por los ciclos de inundación-sequía de los ambientes temporarios que habitan (Micieli *et al.*, 2012). En los periodos de sequía, el mosquito permanece en el ambiente en estado de larva farada dentro del huevo, y resiste hasta la próxima inundación, consumiendo sus reservas energéticas. Una vez que comienzan las lluvias y se forma nuevamente el charco, los huevos inundados eclosionan y las larvas empiezan a alimentarse para continuar su desarrollo. Teniendo en cuenta esto, es posible que el comportamiento de las larvas se relacione con el tiempo de dormancia de los huevos de los cuales provienen. Por ejemplo, los individuos provenientes de huevos de tiempos prolongados, probablemente tiendan a realizar durante más tiempo comportamientos de alimentación, que aquellos provenientes de huevos de periodos más cortos.

Se plantearon dos objetivos, el primero fue evaluar si el parasitismo producido por *S. spiculatus* altera el comportamiento de las larvas de *O. albifasciatus*. La hipótesis planteada en relación a este objetivo es que el comportamiento de las larvas parasitadas difiere del de aquellas no parasitadas,

observándose en las primeras una disminución de la actividad en general. El segundo objetivo fue determinar si el tiempo de dormancia de los huevos de los cuales provienen las larvas del mosquito, tiene algún efecto sobre el comportamiento de las mismas, estén estas parasitadas o no por el nematodo. La hipótesis planteada en relación a este objetivo es que el aumento en los tiempos de dormancia incrementa las diferencias observadas en el comportamiento entre larvas parasitadas y no parasitadas.

III. Materiales y métodos

Diseño experimental y procedimientos

El experimento consistió en la evaluación del comportamiento de larvas de *O. albifasciatus* parasitadas y no parasitadas (control) por *S. spiculatus*, las cuales provenían de huevos que permanecieron por 2, 4 o 6 meses en estado de dormancia. Los huevos almacenados provenían de hembras que habían colocado sus posturas el 2 de mayo de 2016, por lo cual las observaciones se realizaron en julio, septiembre y noviembre del mismo año, para los tratamientos de 2, 4 y 6 meses respectivamente.

Las larvas de *O. albifasciatus* fueron obtenidas luego de sumergir los huevos almacenados en 40 ml de agua declorinada con el agregado de 10 mg de alimento para peces, en una cápsula de Petri, durante 24 horas. Luego del nacimiento, las larvas fueron transferidas a bandejas de mayor volumen y alimentadas *ad libitum* con alimento balanceado para conejo (el cual fue previamente molido y tamizado), hasta alcanzar el segundo estadio larval. Una vez alcanzado este estadio, los individuos fueron destinados a la infección del nematodo o al grupo control.

Las formas infectantes de *S. spiculatus* se obtuvieron inundando durante 24 horas las cápsulas en donde fueron criados. Transcurrido ese tiempo se extrajo el agua junto con los preparásitos, los cuales fueron contados bajo microscopio estereoscópico, separados en grupos de 70 individuos y colocados en bandejas con 600 ml de agua declorada. En cada bandeja se incorporó, 24 horas antes, 100 mg de alimento balanceado para conejos, molido y tamizado, como alimento para las larvas del mosquito. La infección se promovió exponiendo durante 24 horas, 10 larvas de segundo estadio de *O. albifasciatus* a 70 formas infectantes del nematodo en cada recipiente, de tal forma de establecer una relación 7:1 parásito-hospedador. Luego las larvas del culícido fueron criadas hasta el cuarto estadio, y una vez alcanzado este, fueron observadas por transparencia para verificar la presencia de al menos un nematodo. Los individuos parasitados se colocaron inmediatamente en los recipientes para observar su comportamiento. Para el grupo control se siguió el mismo procedimiento pero sin exponer los individuos al parásito.

El número de larvas para cada tratamiento, correspondientes a cada fecha, dependió del número de individuos disponibles al momento de realizar las infecciones. En el tratamiento de dos meses se utilizaron 19 larvas de cuarto estadio de *O. albifasciatus* parasitadas y 19 larvas no parasitadas como grupo control. Para el tratamiento de cuatro meses, se dispusieron 36 larvas parasitadas y 24 larvas no parasitadas, y en el tratamiento de seis meses, se utilizaron 30 larvas infectadas y la misma cantidad de individuos no parasitados como control.

Una hora antes de iniciar las observaciones se colocaron las larvas en recipientes de acrílico de 4 cm de diámetro y 5 cm de alto (Fig. 1), conteniendo una solución de 40 ml de agua de cloro y 10 mg de alimento. Además, se dispuso una tapa circular de color negro de 10 cm de diámetro, sobre cada abertura de los recipientes, para evitar alteraciones del comportamiento por cambios en la iluminación.

Todos los procedimientos detallados anteriormente transcurrieron en una habitación con temperatura constante a 23 °C y fotoperiodo de luz/oscuridad de 12:12 horas.

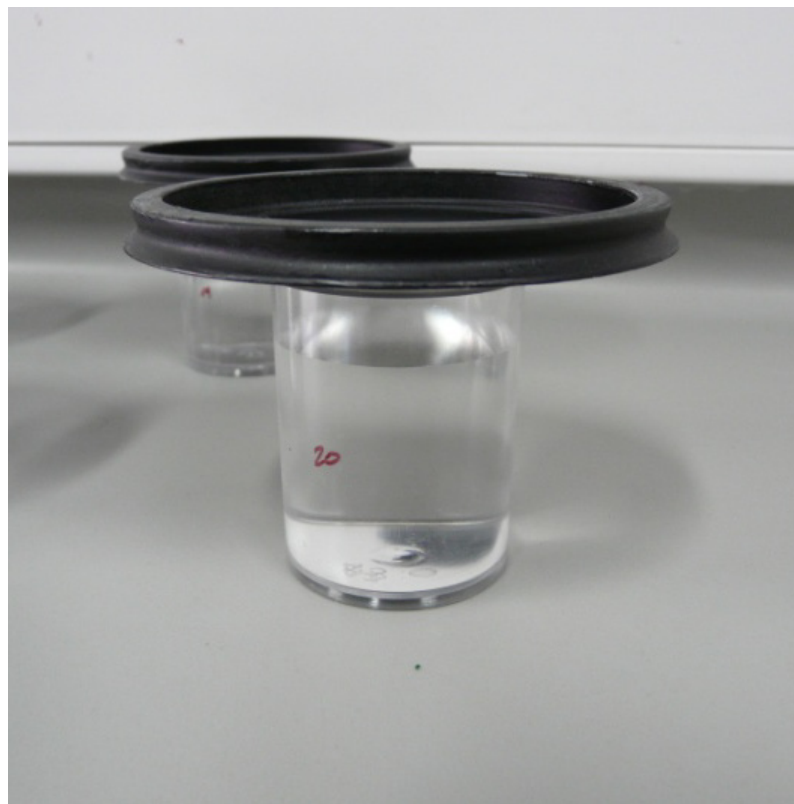


Figura 1. Recipiente utilizado para la observación de los comportamientos de las larvas de *Ochlerotatus albifasciatus*.

Registro de los comportamientos

Para el registro de las observaciones se utilizó el método de Evaluación Ciega por Terceros (*Observer-blind*) que consiste en recurrir a un tercero, que desconoce el tratamiento que está recibiendo cada individuo, para la valoración de la respuesta (Tato, 1998). Este método es una herramienta que permite prevenir que los resultados de una investigación puedan estar influenciados por el sesgo del observador. A cada larva se le asignó aleatoriamente un número, siendo desconocido para el observador si la larva estaba parasitada (tratamiento) o no (control). El grupo de control se utilizó como línea de base para determinar si los parásitos tuvieron algún efecto significativo sobre los comportamientos de las larvas.

Cada individuo se observó por única vez durante cinco minutos, a ojo desnudo desde una distancia de 0,5 metros del recipiente. La duración y frecuencia de los comportamientos se registró con la ayuda del programa Etolog 2.25 (Ottoni, 2000). Las categorías de comportamiento (Tabla 1) se eligieron en base a observaciones previas del comportamiento de las larvas de *O. albifasciatus* (Fig. 2), durante la cría en condiciones de laboratorio en el marco de los experimentos de los capítulos 1 y 2, y utilizando como referencia las categorías planteadas por Wise de Valdez (2006).

Tabla 1. Categorías de comportamiento, código y descripción, de las larvas de cuarto estadio de *Ochlerotatus albifasciatus*.

Comportamiento	Código	Descripción
Culebreo	Cu	Movimiento enérgico arqueando el cuerpo en forma de S
Quieto filtrando	Qf	Suspendido desde la superficie del agua con el extremo distal del sifón en contacto con el aire atmosférico, el cuerpo casi en posición vertical y la cabeza en dirección al fondo del recipiente. Filtrando partículas de la columna de agua por medio del movimiento de las piezas bucales.
Alimentándose cerca de la superficie	Su	Trasladándose por un impulso producido por el movimiento de los cepillos bucales, con el extremo distal del sifón en contacto con el aire atmosférico y el cuerpo rígido formando un ángulo de 45° con la superficie del agua.
Alimentándose en interfase	In	Suspendido desde la superficie del agua con el extremo distal del sifón en contacto con el aire atmosférico y el cuerpo formando una "U" con las piezas bucales en contacto con la película superficial del agua.
Sumergido alimentándose de partículas en suspensión	Ss	Alimentándose en la columna de agua sin contacto con el fondo ni con la superficie, realizando movimientos de traslación con el cuerpo rígido, moviéndose a causa del movimiento de los cepillos bucales.
Alimentándose en la pared, raspando la pared	Pa	Realizando movimientos de traslación con las piezas bucales en contacto con la pared del recipiente.
Alimentándose en el fondo	Fo	Con las piezas bucales en contacto con el fondo del recipiente.
Masticando un sustrato	Ms	Manipulando un sustrato con las piezas bucales

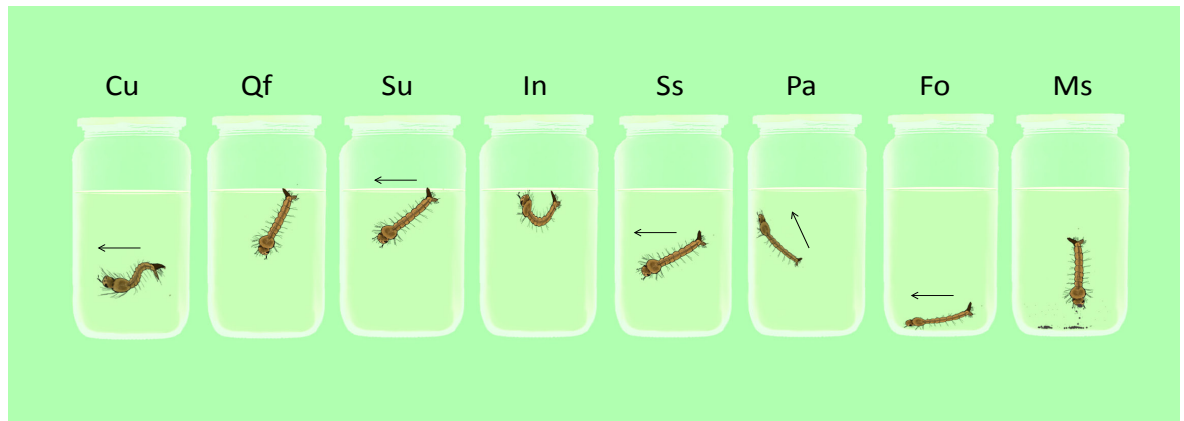


Figura 2. Comportamientos de las larvas de *Ochlerotatus albifasciatus*. Las flechas indican traslación. Los códigos de los comportamientos junto con la descripción se indican en la Tabla 1.

Análisis de los datos

El efecto del tiempo de dormancia de los huevos de *O. albifasciatus*, del parasitismo producido por *S. spiculatus* y de la interacción de ambas variables, sobre cada uno de los comportamientos de las larvas, fue evaluado por medio de un Análisis de Varianza (ANOVA), utilizando los comportamientos como variables dependientes y el estado sanitario (parasitado y no parasitado) y el tiempo de dormancia, como variables independientes. Antes de realizar el análisis, las duraciones de cada comportamiento fueron expresadas como proporciones, las cuales se obtuvieron dividiendo la duración en segundos de cada comportamiento, sobre el tiempo total de observación, para cada larva. Luego se transformaron los datos mediante el arco seno de la raíz cuadrada del valor original, para cumplir los supuestos de normalidad y homocedasticidad del conjunto de los datos. Las medias se compararon utilizando la prueba de LSD Fisher ($p < 0,05$).

La relación entre los diferentes comportamientos en cada tiempo de dormancia fue analizada mediante correlación de Spearman, adecuada para datos no paramétricos, utilizando la duración en segundos de los comportamientos de cada individuo.

Los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017).

III. Resultados

Comportamiento general de *Ochlerotatus albifasciatus* durante el ensayo

En el presente estudio se registró por primera vez el comportamiento de larvas de *O. albifasciatus* en condiciones de laboratorio, observándose una enorme variabilidad dentro de cada tratamiento. Los individuos permanecieron la mayor parte del tiempo, quietos, filtrando en la superficie, nadando mediante culebreo o moviéndose y alimentándose cerca de la superficie (Fig. 3). El comportamiento Culebreo estuvo representado por dos variantes, el desplazamiento vertical desde la superficie del agua hacia el fondo del recipiente y el desplazamiento horizontal en el fondo. La primera acción fue realizada siempre en sentido oblicuo, recorriendo una distancia muy superior a la profundidad del cuerpo de agua y solo persiguió el fin de la traslación del individuo. Sin embargo, la segunda variante, el culebreo en el fondo, se alternó con la alimentación en el fondo, probablemente facilitando la captura de partículas de alimento en este lugar.

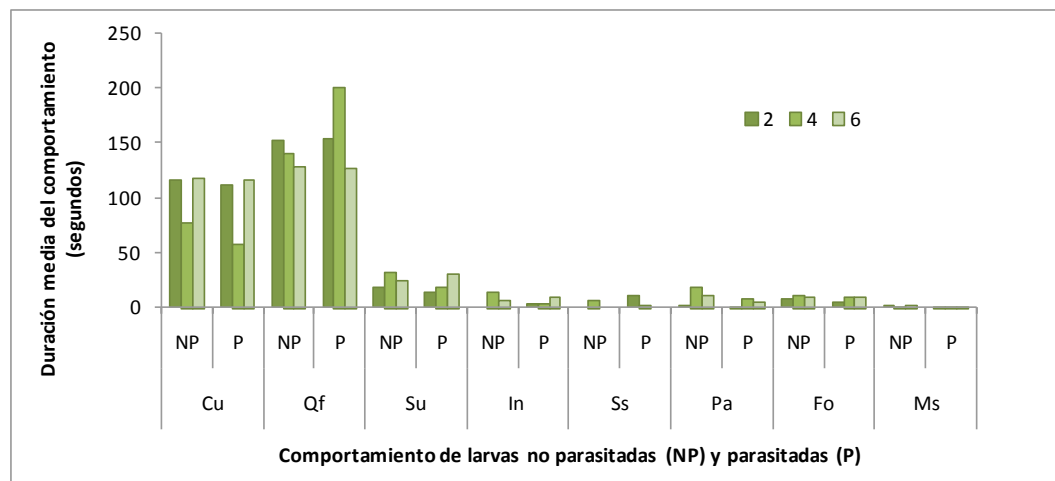


Figura 3. Relevancia de cada categoría de comportamiento de larvas de *Ochlerotatus albifasciatus* en relación a su duración en segundos. Las columnas verde oscuro, verde y verde claro indican los tratamientos de 2, 4 y 6 meses de dormancia respectivamente. Los códigos NP y P indican larvas no parasitadas y parasitadas respectivamente. Los códigos de los comportamientos se indican en la Tabla 1.

Los ANOVA mostraron que los comportamientos Culebreo (Cu) y Alimentándose en la pared (Pa), variaron en función del tiempo de dormancia de los huevos y no presentaron diferencias significativas en relación al parasitismo de *S. spiculatus*, ni a la interacción de ambas variables. El resto de los comportamientos evaluados no variaron entre los tratamientos ($p > 0,05$) (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de los ANOVA para los comportamientos de las larvas de *Ochlerotatus albifasciatus* en función del tiempo de dormancia de los huevos de los cuales provenían, del parasitismo producido por *Strelkovimermis spiculatus* y de la interacción de ambos factores. Los códigos de los comportamientos se indican en la Tabla 1. gl: grados de libertad, CM: cuadrados medios; F: estadístico, p: probabilidad.

Comportamiento	Variable	gl	CM	F	p
Cu	Parasitado	1	0,12	0,56	0,4548
	Tiempo de dormancia	2	0,88	4,2	0,0168
	Parasitado*Tiempo de dormancia	2	0,02	0,09	0,9097
	Error	152	0,21		
Qf	Parasitado	1	0,31	1,2	0,2744
	Tiempo de dormancia	2	0,59	2,3	0,1041
	Parasitado*Tiempo de dormancia	2	0,31	1,19	0,306
	Error	152	0,26		
Su	Parasitado	1	0,02	0,22	0,638
	Tiempo de dormancia	2	0,04	0,46	0,6318
	Parasitado*Tiempo de dormancia	2	0,03	0,31	0,7342
	Error	152	0,09		
In	Parasitado	1	0,001	0,03	0,8564
	Tiempo de dormancia	2	0,02	0,5	0,6046
	Parasitado*Tiempo de dormancia	2	0,02	0,56	0,5719
	Error	152	0,03		
Ss	Parasitado	1	0,01	1,15	0,2847
	Tiempo de dormancia	2	0,02	1,66	0,1943
	Parasitado*Tiempo de dormancia	2	0,03	2,58	0,0793
	Error	152	0,01		
Pa	Parasitado	1	0,09	3,74	0,0548
	Tiempo de dormancia	2	0,07	3,08	0,0488
	Parasitado*Tiempo de dormancia	2	0,02	0,9	0,4085
	Error	152	0,02		
Fo	Parasitado	1	0,02	1,08	0,3009
	Tiempo de dormancia	2	0,01	0,3	0,7422
	Parasitado*Tiempo de dormancia	2	0,0044	0,24	0,7852
	Error	152	0,02		
Ms	Parasitado	1	0,01	1,56	0,2134
	Tiempo de dormancia	2	0,002	0,57	0,566
	Parasitado*Tiempo de dormancia	2	0,0027	0,72	0,4885
	Error	152	0,0037		

El comportamiento Culebreo varió significativamente en función del tiempo de dormancia de los huevos pero no difirió en relación al parasitismo o a la interacción entre este y el tiempo de dormancia. Los individuos provenientes de huevos de 4 meses realizaron durante menos tiempo esta acción que aquellos de 2 y 6 meses, los cuales no variaron entre sí (Fig. 4).

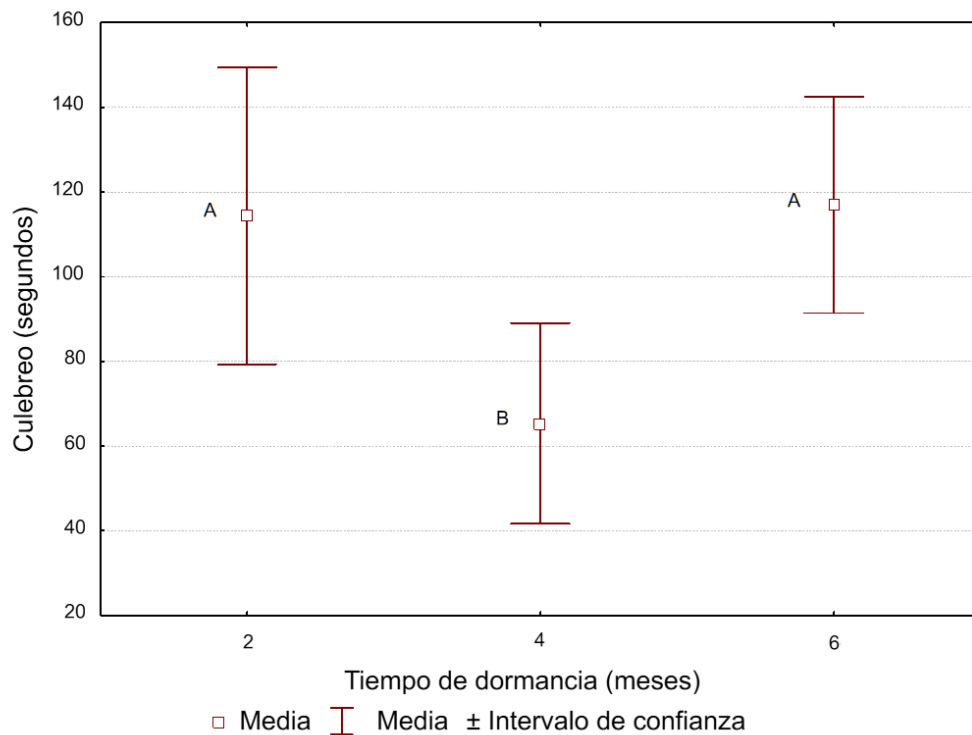


Figura 4. Duración del comportamiento Culebreo (media \pm 95 % intervalos de confianza) entre los diferentes tiempos de dormancia. Los puntos rojos indican las medias y las llaves indican los intervalos de confianza. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

El comportamiento Alimentándose en la pared varió en función del tiempo de dormancia pero no presentó diferencias en relación al parasitismo ni a la interacción. Este comportamiento aumentó con el incremento del tiempo de dormancia, resultando menor en el tratamiento de 2 meses que en el de 4 y 6 meses, los cuales no difirieron entre sí (Fig. 5).

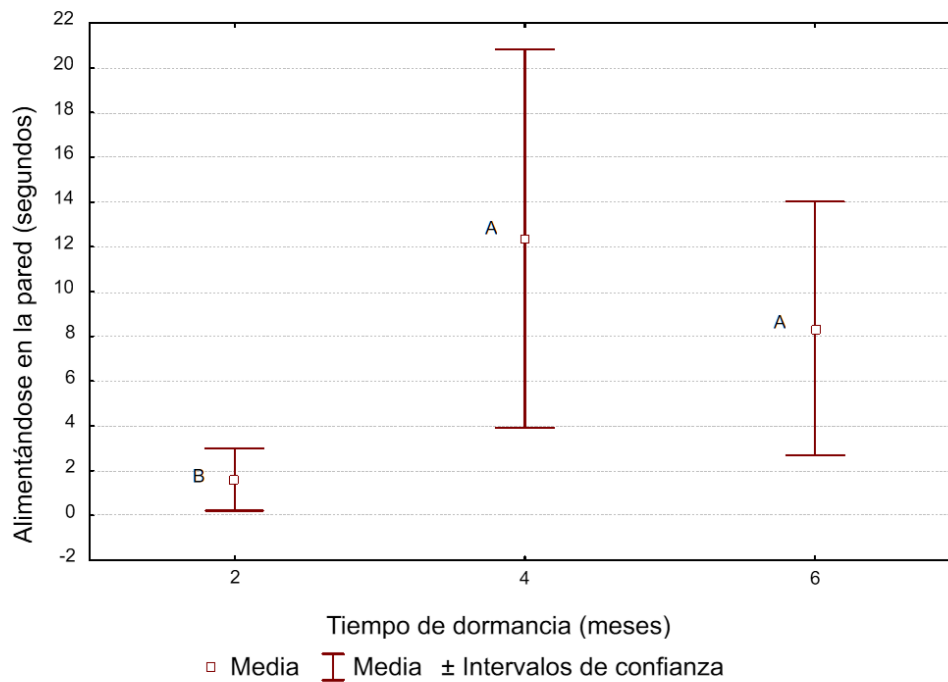


Figura 5. Duración del comportamiento Alimentación en la pared (media \pm 95 % intervalos de confianza) entre los diferentes tiempos de dormancia. Los puntos rojos indican las medias y las llaves indican los intervalos de confianza. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

Análisis de correlaciones entre los comportamientos

En la Tabla 3 se muestra el coeficiente de correlación para cada par de comportamiento, correspondientes a los tres tiempos de dormancia, indicando en negrita las relaciones significativas ($p < 0,05$). Las correlaciones más fuertes y que se repitieron en los tres tiempos de dormancia, fueron Culebreo-Quietos filtrando (correlación negativa) y Culebreo-Alimentándose en el fondo (correlación positiva). Otras asociaciones que se observaron en los tres tiempos, fueron Quietos filtrando-Alimentándose en el fondo (correlación negativa) y Alimentándose en la pared-Alimentándose en el fondo (correlación positiva) (Tabla 3).

Tabla 3. Correlación de Spearman (Coeficientes) de los comportamientos de las larvas de *Ochlerotatus albifasciatus* provenientes de huevos de 2, 4 y 6 meses de dormancia. Los valores en negrita indican correlaciones significativas ($p < 0,05$). Los códigos de los comportamientos se indican en la tabla 1.

Tiempo de dormancia (meses)		Cu	Qf	Su	In	Ss	Pa	Fo
2	Qf	-0,91						
	Su	0,05	-0,26					
	In	-0,01	-0,20	0,37				
	Ss	-0,04	-0,06	-0,14	-0,05			
	Pa	0,16	-0,18	0,20	0,33	-0,15		
	Fo	0,64	-0,64	0,14	0,19	0,11	0,41	
	Ms	0,09	-0,02	0,13	-0,07	-0,13	0,59	0,18
4	Qf	-0,75						
	Su	-0,13	-0,30					
	In	-0,18	-0,12	0,15				
	Ss	0,08	-0,10	-0,10	-0,05			
	Pa	0,23	-0,47	0,21	0,27	0,24		
	Fo	0,70	-0,52	-0,13	-0,15	0,21	0,42	
Ms	0,30	-0,33	0,08	-0,09	-0,06	0,30	0,33	
6	Qf	-0,66						
	Su	-0,36	-0,18					
	In	-0,19	-0,09	0,02				
	Ss	0,00	0,00	0,00	0,00			
	Pa	0,21	-0,24	0,19	0,07	0,00		
	Fo	0,56	-0,42	-0,10	-0,30	0,00	0,32	
	Ms	0,16	-0,06	-0,14	-0,12	0,00	-0,04	0,36

III. Discusión

La elección, por parte de la larva, de los comportamientos de alimentación por filtración cerca de la superficie, podría relacionarse con el carácter oportunista de la especie y su capacidad de aprovechar los recursos disponibles en cada situación. La cantidad y calidad de nutrientes disponibles y la composición de la biota de los ambientes acuáticos temporales depende de muchos factores interrelacionados entre sí, como la profundidad del agua, la temperatura, la composición química y la cantidad de oxígeno disuelto, entre otros (Williams, 2006). Debido a que estos factores pueden variar a lo largo del tiempo y de un charco a otro en una misma región, es esperable que las larvas presenten una batería de comportamientos adecuados para completar su desarrollo preimaginal. De esta manera, es posible que en las condiciones del experimento, el filtrado cerca de la superficie, ya sea estando quietos (Qf) o moviéndose (Su), haya sido la mejor estrategia de alimentación de los individuos. Sin embargo en la naturaleza, probablemente desarrollen con mayor frecuencia otros comportamientos, adecuados para los diferentes sustratos que pueden encontrar en los ambientes. En relación a esto, durante la cría en laboratorio de larvas recolectadas en el campo junto con agua, materia orgánica y diversos sustratos del ambiente, se observó con mayor frecuencia el cepillado de superficies rígidas, como las paredes de los recipientes o la manipulación de sustratos con las mandíbulas, comparado a lo registrado en el ensayo. Estas diferencias podrían deberse a que el tiempo en el que transcurrió el ensayo no fue suficiente para el desarrollo de microorganismos en las paredes de los recipientes, y a la falta de sustratos disponibles que pudieran manipular.

En lo referido al comportamiento de las larvas de mosquitos en relación con el parasitismo causado por mermitidos, en algunos estudios se ha indicado que los individuos parasitados disminuyen su nivel de actividad (Vance y Peckarsky, 1997; Wise de Valdez, 2006). Wise de Valdez (2006) reportó que las larvas de cuarto estadio de *A. aegypti* parasitadas por *S. spiculatus*, presentaron comportamientos de descanso con mayor frecuencia que sus pares no parasitadas. Observaciones similares fueron hechas por Galloway y Brust (1985), quienes además indicaron que todas las larvas de *Aedes vexans* Meigen del cuarto estadio, parasitadas por *R. culicivora* presentaron una notable reducción de los cuerpos grasos. Este síntoma, junto con la inhibición del desarrollo de los discos preimaginales, la atrofia de la musculatura y el daño del

epitelio del tubo digestivo, son comunes en los estadios larvales de culícidos parasitados por nematodos mermitidos (Platzer, 2007). Estas alteraciones en los tejidos también fueron detalladas por Reboledo *et al.* (2016), en larvas de *C. pipiens* parasitadas por *S. spiculatus*. En el presente estudio, el parasitismo producido por *S. spiculatus* no se relacionó con una modificación del comportamiento de las larvas del cuarto estadio de *O. albifasciatus*. Sin embargo, a pesar de que no se evaluaron los daños en los tejidos del hospedador, al igual que en el estudio de Micieli *et al.* (2012), se pudo observar a simple vista, que las larvas de cuarto estadio de *O. albifasciatus* presentaban toda la cavidad abdominal ocupada por el nematodo (Anexo, Fig. 2). En los trabajos citados anteriormente, la reducción de la actividad de las larvas infectadas, probablemente se relacione con el daño que ocasiona el parásito en los tejidos de estas. Estas consecuencias probablemente aumenten en el final del cuarto estadio larval del hospedador, cuando el nematodo ya logró su desarrollo parasítico y está pronto a emerger. Se desconoce si en los estudios citados, las larvas de cuarto estadio fueron observadas inmediatamente después de la muda, o luego de uno o más días de haber alcanzado ese estadio. Durante esta última etapa de la interacción parásito-hospedador, el comportamiento podría ser considerablemente diferente dependiendo del desarrollo del nematodo y su preparación para emerger. Teniendo en cuenta que en el presente estudio las observaciones fueron realizadas inmediatamente después de que el hospedador alcanzó el cuarto estadio, las diferencias de los resultados con los estudios citados podrían relacionarse con el momento en el cual fueron observadas las larvas parasitadas.

En relación al periodo de dormancia, se conoce que durante el mismo, la larva farada dentro del huevo consume parte de sus reservas energéticas para sobrevivir (Danks, 1987). De esta manera, los individuos provenientes de huevos que permanecieron durante más tiempo en estado de dormancia, probablemente hayan experimentado mayor estrés nutricional durante su desarrollo larval, por comenzar esta etapa con menos reservas, que aquellos que provinieron de huevos de tiempos cortos. A pesar de que no existan estudios previos sobre este aspecto y su relación con el parasitismo, algunos autores han indicado que los efectos de este último son similares a aquellos causados por la privación de alimento en larvas no parasitadas (Wise de Valdez, 2006; Galloway y Brust, 1985). En el presente estudio, a pesar de que se observó un cambio en el comportamiento de culebreo entre larvas provenientes de diferentes tiempos,

estas diferencias no indicaron una relación lineal entre ambas variables, por lo cual no es posible hacer inferencias sobre el efecto del aumento del tiempo de dormancia en el comportamiento de culebreo de las larvas. El aumento de la alimentación en la pared por parte de los individuos de los tiempos de dormancia más largos, podrían indicar que estos estuvieron más activos, probablemente por la búsqueda de alimento, que los individuos provenientes de huevos con un periodo de dormancia más corto.

Por otro lado, la correlación entre los comportamientos Masticando un sustrato y Alimentándose en el fondo en los tiempos de 4 y 6 meses, a diferencia de lo observado para el tiempo de 2 meses, también podría sugerir un mayor esfuerzo relacionado a la búsqueda de alimento de estas larvas en relación a aquellas provenientes de huevos que experimentaron un periodo de dormancia más corto.

Los resultados de este estudio muestran que en las condiciones del ensayo, el tiempo de dormancia de los huevos fue un factor más relevante que el parasitismo, en relación al cambio de comportamiento de las larvas. La falta de relación entre los comportamientos y el parasitismo sugiere una gran tolerancia de *O. albifasciatus* al desarrollo parasítico de *S. spiculatus* (hasta que finalmente muere por la emergencia de este último). Esto concuerda con el estudio de Campos y Sy (2003), donde se menciona que la baja mortalidad en los primeros estadios de *O. albifasciatus* se podría deber a la alta tolerancia al parásito, durante esos estadios, permitiendo el desarrollo completo de *S. spiculatus*.

DISCUSIÓN GENERAL, PROYECCIONES FUTURAS y CONCLUSIONES

Los mosquitos Aedini, a diferencia del resto de los Culicidae, son los únicos que presentan huevos capaces de permanecer en estado latente durante largos periodos de sequía hasta que el ambiente se inunda nuevamente. Se observó que algunas especies de *Ochlerotatus* y *Psorophora* permanecen en dormancia y viables hasta cuatro años (Clements, 1992). Para *O. albifasciatus* en particular, se observó que pueden permanecer en ese estado hasta dos años y medio (Campos, 2008). Esta característica les otorga a los individuos de esa especie, la posibilidad de prolongar el tiempo en el estado de larva farada, permitiendo una mayor longevidad en este estado. Esto los diferencia de otros culícidos, por ejemplo las especies del género *Culex*, en los que la eclosión ocurre pocas horas después de las posturas. Teniendo en cuenta la longevidad de los huevos de *O. albifasciatus*, y las epizootias producidas por *S. spiculatus* en los estados inmaduros de este mosquito, los experimentos de esta tesis se planificaron en función de la interacción entre estas especies. En este estudio se consideró que la prolongada latencia disminuye las reservas del huevo, y en consecuencia, las larvas que emerjan de ellos van a estar en condiciones nutricionales diferentes.

Hasta el momento se ha estudiado muy poco este sistema parásito-hospedador y los factores que intervienen en las altas tasas de infecciones observadas en condiciones de campo por varios autores. Esos picos estacionales en el parasitismo, han sido atribuidos a que ambas especies ocurren sincrónicamente en los charcos. Sin embargo, también se han documentado bajas tasas de parasitismo en los mismos charcos, sin haberse llegado a una conclusión que permitiera explicar porqué algunas veces las infecciones son tan altas que afectan prácticamente a toda la cohorte del mosquito, y otras veces no. En esta tesis se abordaron diversos enfoques con el objetivo de dilucidar algunos de los factores que podrían explicar esas observaciones en la naturaleza. Se estudió el efecto de la edad de los huevos del mosquito y la densidad de parásitos sobre la infección de las larvas, y también el efecto de la edad de los huevos y el parasitismo sobre el comportamiento de las larvas, para abordar la hipótesis de que el parasitismo producido por *S. spiculatus* afecta en forma diferencial a las larvas de *O. albifasciatus* en función de las variables analizadas.

La baja proporción de larvas parasitadas en la mayoría de las infecciones realizadas, comparada con otros trabajos donde se estudió el parasitismo de *S. spiculatus* en otras especies de mosquitos (Achinelly, 2004), podría estar relacionada con la utilización del hospedador natural del nematodo, *O. albifasciatus*. Es probable que esta especie presente estrategias de escape a las formas infectantes más adecuadas que otros mosquitos, tal vez como resultado de una coevolución con el nematodo. Por otro lado, la baja prevalencia de infección de *O. albifasciatus*, comparada con algunas observaciones realizadas en condiciones naturales (Micieli *et al.*, 2012; Campos y Sy, 2003), sugiere que la relación numérica entre las formas infectantes y las larvas del mosquito en el campo podrían ser muy superiores a la utilizada en los ensayos de laboratorio (Micieli y García, 1999). Esto podría explicar las altas prevalencias e intensidades del parasitismo en la naturaleza, aún en larvas que parecen tener un buen comportamiento de escape frente al parásito.

Luego de la evaluación del efecto del tiempo de dormancia de los huevos de *O. albifasciatus* sobre la susceptibilidad de las larvas al parasitismo producido por *S. spiculatus*, se concluyó que no existe una relación lineal entre ambas variables, es decir que la susceptibilidad de las larvas a la infección por el nematodo no necesariamente aumenta con el incremento del tiempo de dormancia de los huevos de los cuales provienen.

Por otro lado, a pesar de que las retenciones y melanizaciones de nematodos dentro de las larvas del mosquito no variaron en función de los factores medidos, se observaron en mayor proporción en el grupo de larvas donde hubo mayor intensidad del parasitismo. La melanización de parásitos internos es una reacción de defensa que ha sido observada en varias especies de mosquitos (Christensen *et al.*, 2005). Considerando la estrecha relación entre *O. albifasciatus* y *S. spiculatus*, sería probable que existan entre estos, presiones selectivas que promuevan la adquisición de este tipo de defensas contra el parásito.

En relación al comportamiento de las larvas, la mayor afectación del mismo por el tiempo de dormancia de los huevos que por el parasitismo (al menos en la etapa del desarrollo del mosquito evaluada), sugiere una gran tolerancia de *O. albifasciatus* al desarrollo parasítico de *S. spiculatus* (hasta que finalmente muere por la emergencia de este último). El aumento del tiempo dedicado a la alimentación en la pared por parte de las larvas de los tiempos de dormancia más largos, podría ser el resultado de la búsqueda de alimento para compensar

una mayor deficiencia de reservas energéticas comparadas con larvas provenientes de huevos de tiempos cortos. Esta conclusión también se relaciona con la disminución de la supervivencia en las larvas de huevos que tuvieron dormancias prolongadas, observada en el primer capítulo. Pero si consideramos esta explicación, el desarrollo del parásito a expensas del hospedador, principalmente consumiendo lípidos de reserva (Reboredo *et al.*, 2016), debería acrecentar estas diferencias en el comportamiento. Estas observaciones dejan algunos interrogantes sobre los efectos del parasitismo en el comportamiento de las larvas. Como las alteraciones del comportamiento producidas por nematodos pueden variar de acuerdo al estado de desarrollo del hospedador (Wise de Valdez, 2006), es probable que, de existir cambios en el comportamiento en las larvas parasitadas de *O. albifasciatus*, estos sean evidentes en los estadios más tempranos del desarrollo del hospedador y no en el último estadio larval. Estas son hipótesis que surgen de las conclusiones de este trabajo, las cuales tendrían que ser corroboradas en futuros estudios enfocados en este aspecto.

En lo referido a la utilización de este nematodo como agente de control biológico, el conocimiento obtenido en la tesis indica que *O. albifasciatus* estaría mejor preparado para enfrentar la infección de *S. spiculatus* que otras especies de mosquitos, en las cuales la acción del parásito sería más eficaz. Los nuevos conocimientos obtenidos en esta tesis pueden ser utilizados como base para realizar estudios comparativos sobre las capacidades del nematodo para parasitar otras especies de mosquitos en ambientes naturales diferentes, como por ejemplo, *Culex pipiens*, un mosquito reconocido como hospedador natural, cuyos huevos no soportan desecación, y se desarrolla en charcos permanentes.

En síntesis se puede concluir que:

La longevidad de los huevos de *O. albifasciatus* afecta la supervivencia de las larvas y el comportamiento de alimentación de las mismas, pero no necesariamente implica cambios en la susceptibilidad al parasitismo producido por *S. spiculatus*.

La variación de la altura del cuerpo de agua donde ocurren las infecciones y la relación parásito-hospedador utilizada en las mismas no afecta el parasitismo de *S. spiculatus* en larvas de *O. albifasciatus*, al menos en el rango utilizado en este estudio.

En relación al cambio de comportamiento de las larvas, los resultados de este estudio mostraron que el tiempo de dormancia de los huevos fue un factor

más relevante que el parasitismo. La falta de relación entre los comportamientos y el parasitismo sugiere una gran tolerancia de *O. albifasciatus* al desarrollo parasítico de *S. spiculatus*, hasta que finalmente muere por la emergencia de este último.

Anexo

El siguiente es un grupo de imágenes que intenta reflejar parte del trabajo realizado referido a la manipulación de los organismos y documentar algunas observaciones de la interacción entre *Ochlerotatus albifasciatus* y *Strelkovimermis spiculatus*.

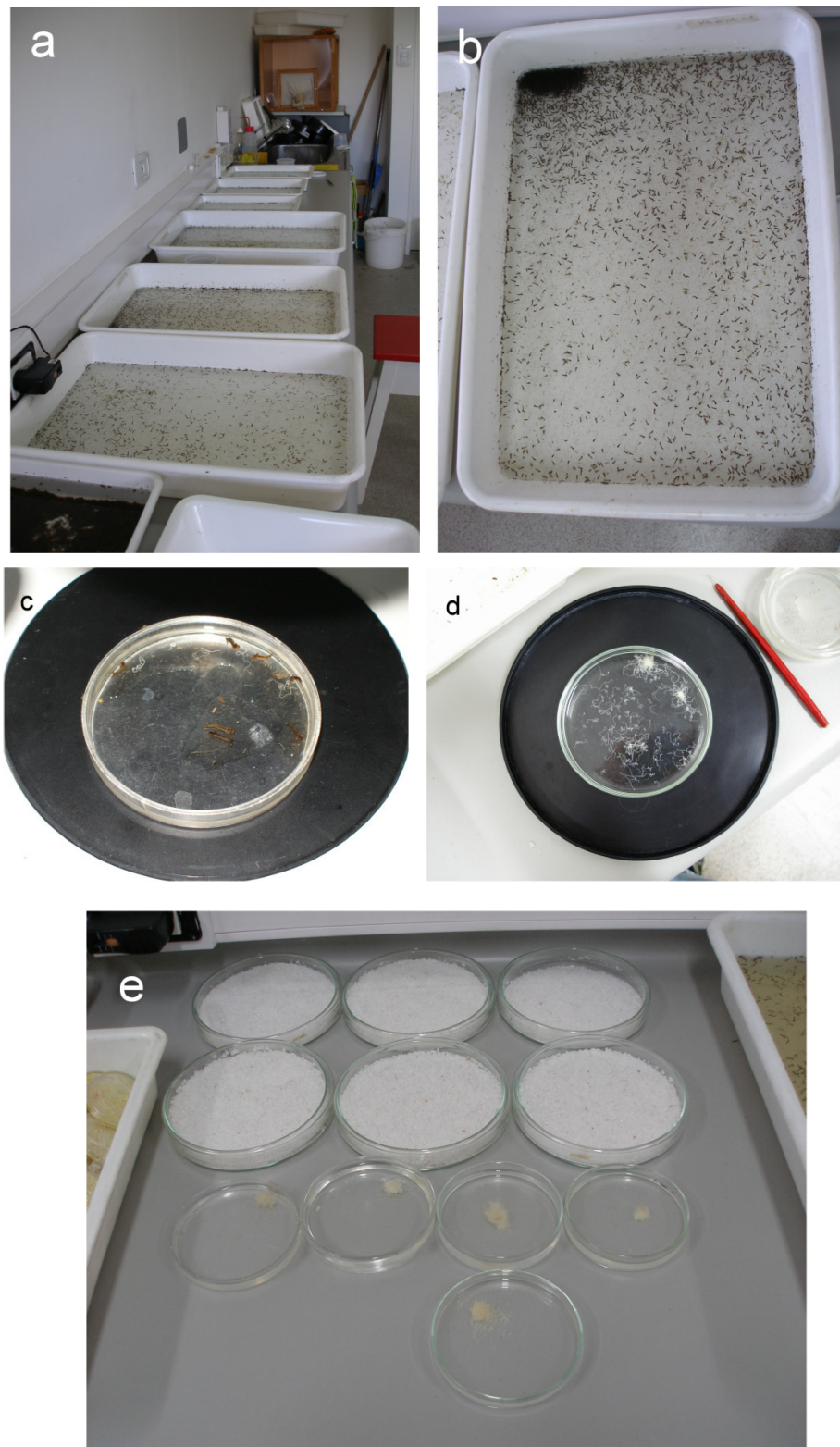


Figura 1. Obtención de *Strelkovimermis spiculatus* a partir de larvas de *Ochlerotatus albifasciatus* recolectadas en campo. a-b: Larvas de *O. albifasciatus* aisladas de otros organismos y de restos vegetales provenientes del charco, c: emergencia de los juveniles de *S. spiculatus*, d-e: acondicionamiento y armado de la colonia del nematodo.

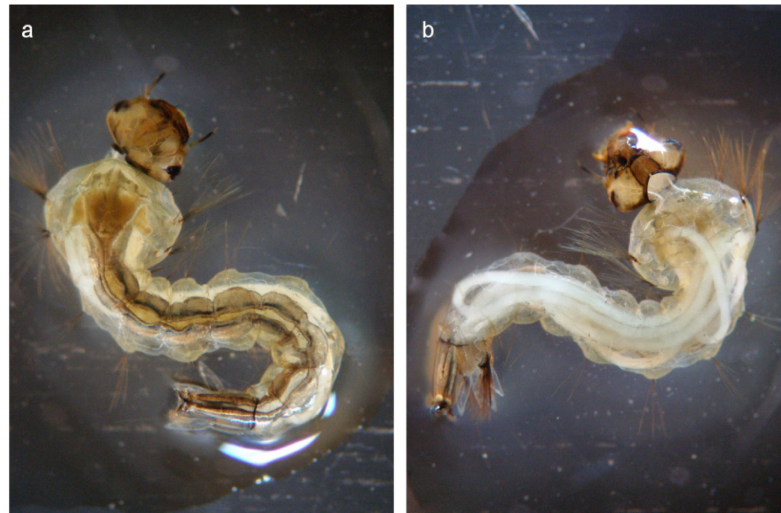


Figura 2. Larva de cuarto estadio de *Ochlerotatus albifasciatus* parasitada por *Strelkovimermis spiculatus*. a: vista dorsal, b: vista ventral (15X).



Figura 3. Deformaciones observadas en el cuerpo de larvas parasitadas, a-b: larvas que aun tenían nematodos en su interior (b: nematodo emergiendo), d: comparación entre larva no deformada y deformada (a,b,c: 15X; d:10X).



Figura 4. Larvas con nematodos retenidos en su interior, a: nematodos en la cavidad abdominal y torácica, b-c: nematodos retenidos en la cápsula cefálica y d: nematodo muerto antes de completar la emergencia por el sifón del hospedador (15X).

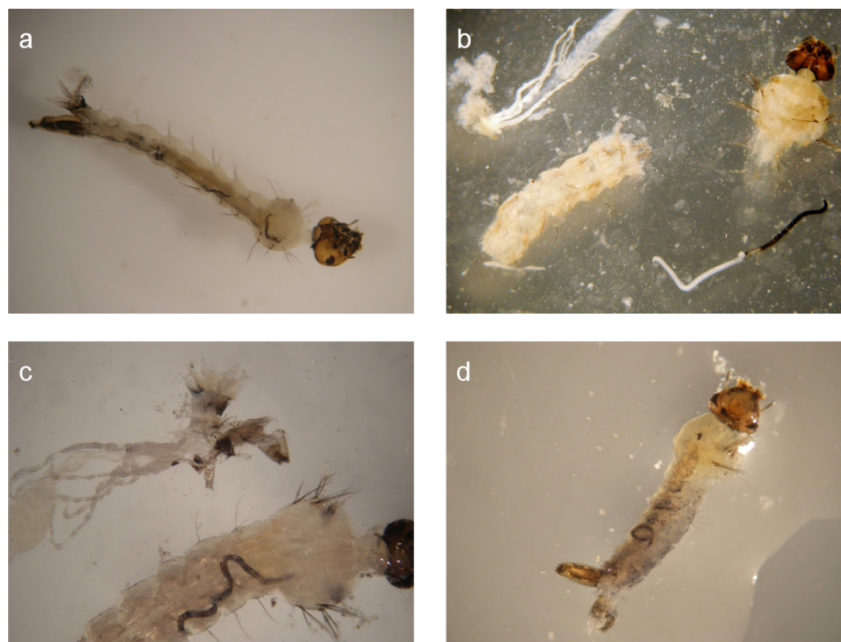


Figura 5. Nematodos retenidos melanizados en el abdomen (a, b, c y d) y en el tórax (a). b: destrucción del cuerpo del hospedador para visualizar la melanización parcial del nematodo (a, b, d:15X; c:20X).

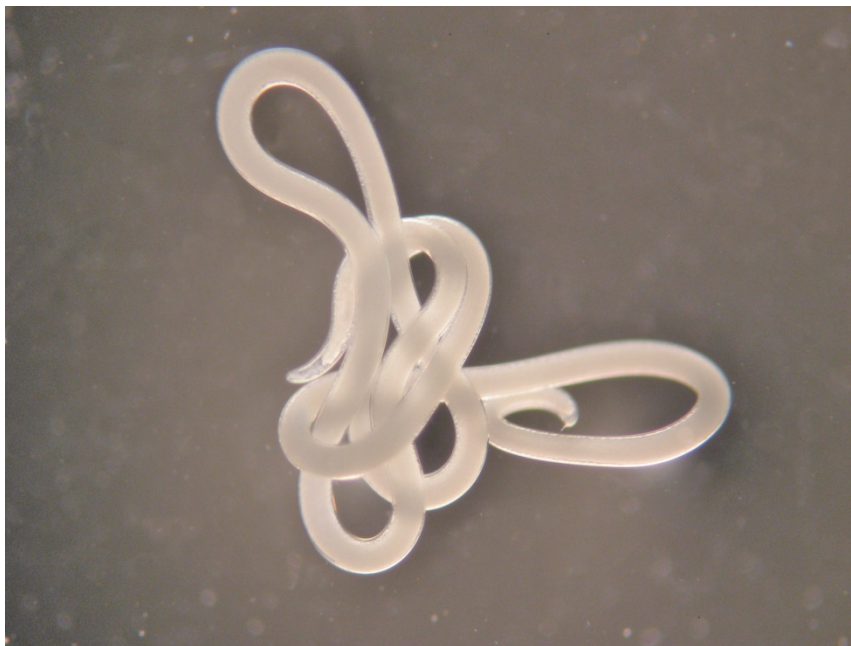


Figura 6. Juvenil de *Strelkovimermis spiculatus* (J4) (30X).

Referencias bibliográficas

Achinelly M. F. 2004. Estudios referentes a la utilización del nematodo *Strelkovimermis spiculatus* Poinar & Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae) como agente de control biológico de culícidos (Diptera: Culicidae) (Tesis). Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Achinelly M. F., Micieli M. V. 2010. Optimizing laboratory production of *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) with a discussion of potential release strategies for mosquito biological control. *Biological Control* 57 (1): 31-36.

Achinelly M. F., Micieli M. V. 2013. Host range of the parasite *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) in Argentina mosquitoes. *Journal of Vector Ecology* 38 (1): 69-73.

Almirón W. R., Brewer M. E. 1996. Classification of immature stage habitats of Culicidae (Diptera) collected in Córdoba, Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 91 (1): 1-9.

Avilés G., Sabattini M. S., Mitchell C. M. 1992. Transmission of Western Equine Encephalomyelitis Virus by Argentine *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 29 (5): 850-853.

Bachmann A. O., Casal O. H. 1962. Mosquitos argentinos que crían en aguas salobres y saladas. *Revista de la Sociedad Entomologica Argentina* 25: 21-27.

Barreaux A. M. G., Barreaux P., Koella J. C. 2016. Overloading the immunity of the mosquito *Anopheles gambiae* with multiple immune challenges. *Parasites & Vectors* 9 (210): 1-4.

Becker N., Petric D., Zgomba M., Boase C., Dahl C., Madon M., Kaiser A. 2010. *Mosquitoes and their control*, Springer, New York, USA.

Becnel J. J., Johnson M. A. 1998. Pathogenicity tests on nine mosquito species and several non-target organisms with *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda Mermithidae). *Journal of Nematology* 30 (4): 411-414.

Benton M. J., Pritchard G. 1990. Mayfly locomotory responses to endoparasitic infection and predator presence: the effects on predator encounter rate. *Freshwater Biology* 23 (2): 363-371.

Berón C. M., Campos R. E., Gleiser R. M., Díaz-Nieto L. M., Salomón O. D., Schweigmann N. 2016. Investigaciones sobre mosquitos de Argentina. Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina.

Bhatt S., Gething P. W., Brady O. J., Messina J. P., Farlow A. W., Moyes C. L., Drake J. M. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496 (7446): 504-507.

Bianchini N. R., Sabattini M. S., Bianchini J. P., Gonzales L. E. 1968. Aislamiento de arbovirus del grupo Bunyamwera de mosquitos *Aedes (O) albifasciatus* en la Argentina. *Ciencia e Investigación* 24: 463-468.

Brathwaite Dick O., San Martín J. L., Montoya R. H., del Diego J., Zambrano B., y Dayan G. H. 2012. Review: The History of Dengue Outbreaks in the Americas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 87 (4): 584-593.

Camino N. B. 1988. Efecto del parasitismo múltiple en la determinación del sexo de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda, Mermithidae) en larvas de *Culex pipiens fatigans* Wiedemann, 1828. *Iheringia. Série Miscelanea Porto Alegre* 2: 93-97.

Camino N. B. 1989. Primer registro de culícidos (Diptera: Culicidae) parasitados por *Hydromermis sp.* (Nematoda: Mermithidae). *Neotrópica* 35: 67-70.

Camino N. B., Gonzáles S. E., Reboredo G. R. 2015. Biodiversidad de mermíthidos parasitoides de larvas de dípteros acuáticos (Simuliidae, Culicidae y Chironomidae) en Argentina. *Neotropical Helminthology* 9 (1): 65-71.

Camino N. B., Reboredo G. R. 1994. Biology of *Strelkovimermis spiculatus* Poinar and Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae) parasite of mosquitoes (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. *Neotrópica* 40: 45-48.

Campos R. E. 2008. Long-term storage and viability of *Ochlerotatus albifasciatus* eggs (Diptera: Culicidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 103 (1): 115-117.

Campos R. E., Fernández L. A., Sy V. E. 2004. Study of the insects associated with the floodwater mosquito *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera:

Culicidae) and their possible predators in Buenos Aires Province, Argentina. *Hydrobiologia* 524 (1): 91-102.

Campos R. E., Sy V. E. 2003. Mortality in immatures of the floodwater mosquito *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) and effects of parasitism by *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) in Buenos Aires province, Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (2): 199-208.

Campos R. E., Sy V. E. 2006. Variation in the hatching response of *Ochlerotatus albifasciatus* egg batches (Diptera: Culicidae) in temperate Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 101 (1): 47-53.

Carvajal M. A., Faúndez E. I. 2018. First record of *Aedes albifasciatus* in Magallanes Region, Chile. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 34 (2): 117-119. Christensen B. M., Li J., Chen C., Nappi A. 2005. Melanization immune responses in mosquito vectors. *Trends in Parasitology* 21 (4): 192-199.

Christophers R. 1960. *Aedes aegypti*, the yellow fever mosquito its life history, bionomics and structure. Cambridge at the University Press, London, N. W.

Clements A. N. 1992. *The biology of mosquitoes*. Chapman y Hall, London, UK 1.

Contigiani M. S., Díaz L. A., Spinsanti L. I., Tauro L. B. 2016. Arbovirus Capítulo 13: pp: 157–178. En: Berón C., Campos R. E. Gleiser R. M., Díaz-Nieto L. M., Salomón O. D., Schweigmann N. (Eds.) *Investigaciones sobre Mosquitos de Argentina*. Universidad Nacional de Mar del Plata.

Curto S. I., Andrade J. H., Chuit R., Boffi R. 2013. Historia del control del paludismo en la Argentina. *Boletín de la Academia Nacional de Medicina* 91 (1): 77-93.

Danks H. V. 1987. *Insect dormancy: an ecological perspective*. Biological survey of Canada (Terrestrial arthropods) (Eds). Ottawa, Canada.

Dantur Juri M. J., Zaidenberg M., Claps G. L., Santana M., Almirón W. R. 2009. Malaria transmission in two localities in north-western Argentina. *Malarial Journal* 8: 18.

Darsie Jr. R. F. 1985. Mosquitoes of Argentina Parte I, Keys for identification of adult females and fourth stage larvae in english and spanish (Diptera, Culicidae). *Mosquito Systematics* 17 (3): 153-253.

De Bach P. 1964. *Biological control of insect pests and weeds*. Chapman and Hall, London.

Del Ponte E., Blaksley J. C. 1947. Importancia sanitaria de los Culicidae de la ciudad de Buenos Aires. *La Prensa Médica Argentina* 34: 821-824.

Di Battista C. M., Fischer S., Campos R. E. 2015. Prevalence of parasitism and adult survival time of *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae) parasitized by *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae). *Journal of Vector Ecology* 40 (2): 393-397.

Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C. W. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com>.

Díaz L. A., Llinás G. A., Vázquez A., Tenorio A., Contigiani M. S. 2012. Silent circulation of St. Louis encephalitis virus prior to an encephalitis outbreak in Cordoba, Argentina (2005). *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (1): e1489.

Dong L., Wang Y., Sanad M., Xu Y., Gaugler R. 2017. Foraging strategy for mosquito parasitic nematodes *Romanomermis iyengari* and *Strelkovimermis spiculatus*. *Biological Control* 110: 56-61.

Dyar H. G. 1928. *The mosquitoes of the Americas*. Carnegie Institution of Washington, Washington, USA.

Edwards F. W. 1932. *Genera Insectorum. Diptera, Fam. Culicidae*. Fasc. 194. Desmets-Verteneuil, Brusells.

Eilenberg J., Hajek A., Lomer C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46 (4): 387-400.

Faraway J. J. 2006. *Extending the Linear Model with R*. Chapman & Hall/CRC, London.

Ferdig M. T., Beerntsen B. T., Spray F. J., Li J., Christensen B. M. 1993. Reproductive costs associated with resistance in a mosquito-filarial worm system. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 49 (6): 756-762.

Finlay C. J. 1881. El mosquito hipoteticamente considerado como agente de trasmision de la fiebre amarilla. *Anales de la Real Academia de Ciencias Médicas, Físicas y Naturales de la Habana* 18: 147-169.

Fischer S., Marinone M. C., Schweigmann N. 2002. *Ochlerotatus albifasciatus* in rain pools of Buenos Aires: Seasonal dynamics and relation to environmental variables. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97 (6): 767-773.

Fischer S., Schweigmann N. 2008. Association of immature mosquitoes and predatory insects in urban rain pools. *Journal of Vector Ecology* 33 (1): 46-55.

Floore T. G. 2006. Mosquito larval control practices: past and present. *Journal of the American Mosquito Control Association* 22 (3): 527-533.

Floore T. G. 2007. Biorational control of mosquitoes. *Bulletin No. 7. Suplemento de Journal of the Mosquito Control Association* 23 (2): 330 pp.

Fontanarrosa M. S., Marinone M. C., Fischer S., Orellano P. W., Schweigmann N. 2000. Effects of flooding and temperature on *Aedes albifasciatus* development time and larval density in two rain pools at Buenos Aires University City. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 95 (6): 787-793.

Forattini O. P. 1965. *Entomologia médica. Culicini: Culex, Aedes e Psorophora*. Vol. 2. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Forattini O. P. 2002. *Culicidologia Médica. Identificação, Biologia, Epidemiologia*. Vol. 2, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Galloway T. D., Brust R. A. 1985. The effects of parasitism by *Romanomermis culicivorax* (Nematoda: Mermithidae) on growth and development of *Aedes vexans* (Diptera: Culicidae) in laboratory and field tests. *Canadian Journal of Zoology* 63 (10): 2437-2442.

García J. J., Campos R. E., Macía A. 1994. Prospección de enemigos naturales de Culicidae (Diptera) de la selva marginal de Punta Lara. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias* 19 (72): 209-216.

García J. J., Micieli M. V. 2000. Estacionalidad poblacional de los estados inmaduros de *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae) en la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista de Biología Tropical* 48 (2/3): 623-628.

Garzón M. J., Jensen O., Schweigmann N. 2013. Resistance to freezing temperatures in *Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus* (Macquart) eggs (Diptera: Culicidae) from two different climatic regions of Argentina. *Journal of Vector Ecology* 38 (2): 339-344.

Gleave K., Cook D., Taylor M. J., Reimer L. J. 2016. Filarial infection influences mosquito behaviour and fecundity. *Nature, Scientific Reports* 6: 36319.

Gleiser R. M., Urrutia J., Gorla D. E. 2000. Effects of crowding on populations of *Aedes albifasciatus* larvae under laboratory conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 95 (2): 135-140.

Go Y. Y., Balasuriya U. B., Lee C. K. 2014. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clinical and Experimental Vaccine Research* 1: 58-77.

Goddard J. 2008. Infectious diseases and arthropods. 2nd ed., Humana Press, Totowa, USA.

Godfray H. C. J. 2007. Parasitoids. En Levin S. A. *Encyclopedia of Biodiversity*. University of Oxford, Oxford, UK. doi: 10.1016/B0-12-226865-2/00218-2.

Gotelli N. J., Moore J. 1992. Altered host behaviour in a cockroach-acanthocephalan association. *Animal Behaviour* 43 (6): 949-959.

Gratz N. G. 2004. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology* 18: 215-227.

Hillyer J. F., Schmidt S. L., Fuchs J. F., Boyle J. P., Christensen B. M. 2005. Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers. *Cellular Microbiology* 7 (1): 39-51.

Howard L. O., Dyar H. G., Knab F. 1917. The mosquitoes of North and Central America and the west indies. Systematic description (in two parts), part II. 4 (159): 525-1064 pp. Carnegie Institution of Washington, USA.

Juliano S. A. 2009. Species interactions among larval mosquitoes: Context dependence across habitat gradients. *Annual Review of Entomology* 54: 37-56.

Kaiser H. 1991. Terrestrial and semiterrestrial Mermithidae pp: 899 - 966. En: Nickle W. R. (ed.). *Manual of Agricultural Nematology*, Inc. New York and Basel. New York, USA.

Karban R., English-Loeb G. 1997. Tachinid parasitoids affect host plant choice by caterpillars to increase caterpillar survival. *Ecology* 78 (2): 603-611.

Kesavaraju B., Juliano S. A. 2004. Differential behavioral responses to water-borne cues to predation in two container-dwelling mosquitoes. *Annals of the Entomological Society of America* 97 (1): 196-201.

Knight K. L., Stone A. 1977. A catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae). 2nd edition. Thomas Say Found, Entomological Society of America 6: 611 pp.

Koella J. C., Rieu L., Paul R. E. L. 2002. Stage-specific manipulation of a mosquito's host-seeking behavior by the malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*. *Behavioral Ecology* 13 (6): 816-820.

Koella J. C., Sorensen F. L. 2002. Effect of adult nutrition on the melanization immune response of the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Medical and Veterinary Entomology* 16 (3): 316-320.

Kogan M. 1998. Integrated pest management: Historical perspectives and contemporary developments. *Annual Review of Entomology* 43: 243-270.

Kohn Loncarica A., Agüero A. L., Sánchez N. I. 1997. Nacionalismo e internacionalismo en las ciencias de la salud: el caso de la lucha antipalúdica en la Argentina. *Asclepio* 49 (2): 147-163.

Lane J. 1953. Neotropical Culicidae. University of São Paulo, São Paulo, Brasil.

Ledesma N., Harrington L. 2011. Mosquito vectors of dog heartworm in the United States: Vector status and factors influencing transmission efficiency. *Topics in Companion Animal Medicine* 26 (4): 178-185.

Linares M. 2018. Culicidae (Diptera) de zonas periurbanas de San Salvador de Jujuy (Tesis). Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina.

Lourenco de Oliveira R. 1984. Alguns aspectos da ecologia dos mosquitos (Diptera: Culicidae) de uma área de planície (Granjas Calábria), em Jacarepaguá, Rio de Janeiro. I. Frequência comparativa das espécies em diferentes ambientes e métodos de coleta. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 79 (4): 479-490.

Ludlam K. W., Jachowski L. A., Otto G. F. 1970. Potential vectors of *Dirofilaria immitis*. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 157 (10): 1354-1359.

Ludueña Almeida F. F., Gorla D. E. 1995. The biology of *Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus* Macquart, 1838 (Diptera: Culicidae) in Central Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 90 (4): 663-668.

Lynch Arribálzaga F. 1878. Descripción de tres nuevos Culicidae de Buenos Aires. *El Naturalista Argentino* 1 (5): 149-152.

Lynch Arribálzaga F. 1891. Dipterología Argentina. *Revista del Museo de La Plata* 1: 347-377.

Maciá A., García J. J., Campos R. E. 1995. Bionomía de *Aedes albifasciatus* y *Ae. crinifer* (Diptera: Culicidae) y sus enemigos naturales en Punta Lara, Buenos Aires. *Neotrópica* 41: 43-50.

Marcondes C. B., Contigiani M., Gleiser R. M. 2017. Emergent and reemergent arboviruses in South America and the Caribbean: Why so many and why now? *Journal of Medical Entomology* 54 (3): 509-532.

Marquardt W. C., Demaree R. S., Grieve R. B. 2000. *Parasitology & Vector Biology*. Harcourt Academic press, San Diego.

Mesa F. A., Cárdenas J. A., Villamil C. 2005. *Las encefalitis equinas en la salud pública*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Departamento de Salud Animal, Bogotá, Colombia.

Metcalf R. L., Novak R. J. 1994. Pest management in human and animal health. En: Metcalf R. L., Luckman W. H. (Eds). *Insect pest management*. New York: John Wiley & Sons, Inc. New York, USA.

Mieli M. V., García J. J. 1999. Estudios epizootiológicos de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae) en una población natural de *Aedes albifasciatus* Macquart (Diptera: Culicidae) en la Argentina. *Miscellanea Zoologica* 22 (2): 31-37.

Mieli M. V., Risso P., Achinelly M. F., Villar M., Muttis M. 2012. Population dynamics between the mermithid *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) and the floodwater mosquito *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) over time. *Biological Control* 61: 55-63.

Mitchell C. F., Darsie Jr. R. F. 1985. Mosquitoes of Argentina. Part II. Geographic distribution and bibliography (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics* 17 (4): 279-360.

Mitchell C. J., Monath T. P., Sabattini M. S., Daffner J. F., Cropp C. B., Calisher C. H., Darsie Jr. R. F., Jakob W. L. 1987. Arbovirus isolations from mosquitoes collected during and after the 1982-1983 epizootic of Western Equine Encephalitis in Argentina. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 36 (1): 107-113.

MSN 2018a. Boletín Integrado de Vigilancia, Ministerio de Salud de la Nación, Presidencia de la Nación, Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de la Situación de la Salud, 405 (SE 13): 96 pp. <http://www.msal.gob.ar/images/stories/boletines/BIV406SE14.pdf>

MSN 2018b. Boletín Integrado de Vigilancia, Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la Nación, Presidencia de la Nación, Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de la Situación de la Salud 425 (SE 40): 41 pp. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/biv_425_se40.pdf

MSN. 2016. Boletín Integrado de Vigilancia, Ministerio de Salud de la Nación, Presidencia de la Nación, Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de la Situación de la Salud 327 (SE 37): 131 pp. <http://iah.salud.gob.ar/doc/Documento59.pdf>

Müller C. B., Zurich E. 1994. Parasitoid induced digging behaviour in bumblebee workers. *Animal Behaviour* 48 (4): 961-966.

Musso D., Roche C., Robin E., Nahn T., Teissier A., Cao-Lormeau V. 2015. Potential sexual transmisión of zika virus. *Emerging Infectious Diseases* 21 (2): 359-361.

Nickle W. R. 1972. A Contribution to our knowledge of the Mermithidae (Nematoda). *Journal of Nematology* 4 (2): 113-146.

Oliveira Melo A., Malinger G., Ximenes R., Szejnfeld P., Alves Sampaio S., Bispo de Filippis A. 2016. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain anormality and microcephaly: tip of the iceberg?. *Ultrasound in Obstetric and Gynecology* 47: 6-7.

OMS (Organización Mundial de la Salud) 2017a. Nota descriptiva sobre paludismo. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/es/>

OMS (Organización Mundial de la Salud) 2017b. Nota descriptiva sobre filariasis. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs102/es/>

Otoni E. B. 2000. EthoLog 2.2 - a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods, Instruments & Computers* 32 (3): 446-449.

Patterson G. M. 2016. Looking backward, looking forward: The long, torturous struggle with mosquitoes. *Insects* 7 (56): 1–14. doi: 10.3390/insects7040056.

Pérez M. H., Noriega F. G. 2012. *Aedes aegypti* pharate 1st instar quiescence affects larval fitness and metal tolerance. *Journal of Insect Physiology* 58 (6): 824-829.

Pérez Pacheco R., Platzer E. G., Woodward D., Hyman B. C. 2015. Bioassays for comparative infectivity of mermithid nematodes (*Romanomermis iyengari*, *Romanomermis culicivorax* and *Strelkovimermis spiculatus*) for culicine mosquito larvae. *Biological Control* 80 (1): 113-118.

Petersen J. J. 1973. Role of mermithid nematodes in biological control of mosquitoes. *Experimental Parasitology* 33 (2): 239-247.

Petersen J. J., Chapman H. C. 1979. Checklist of mosquito species tested against the nematode parasite *Romanomermis culicivorax*. *Journal of Medical Entomology* 15 (5/6): 468-471.

Picollo M. I., Vassena C., Santo Orihuela P., Barrios S., Zaidemberg M., Zerba E. 2005. High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from northern Argentina. *Journal of Medical Entomology* 42 (4): 637-642.

Platzer E. G. 1981. Biological control of mosquitoes with mermithids. *Journal of Nematology* 13 (3): 257-262.

Platzer E. G. 2007. Mermithid nematodes, En: TG Floore Ed. *Biorational Control of Mosquitoes*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 7 suplemento 2: 58-64.

Poinar G. O., Camino N. B. 1986. *Strelkovimermis spiculatus* n. sp. (Mermithidae: Nematoda) parasitizing *Aedes albifasciatus* Mac. (Culicidae: Diptera) in Argentina. *Journal of Nematology* 18(3): 317-319.

Prosen A. F., Martínez A., Carcavallo R. U. 1960. La familia Culicidae (Diptera) de la ribera fluvial de la Provincia de Buenos Aires. *Anales del Instituto de Medicina Regional*. 6: 59-124.

Reboredo G., Gonzales S., Rusconi J. M., Camino N. B. 2016. Cambios morfológicos producidos por el parasitismo de *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda, Mermithidae) en larvas del mosquito *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae). *Ciencias Morfológicas* 18 (2): 11-16.

Rodríguez Morales A. J., Bolívar Mejía A., Alarcón Olave C., Calvo Betancourt L. S. 2015. *Plasmodium vivax* Malaria in Latin America 89–111. En: Franco Paredes C., Santos Preciado J. (Eds) *Neglected Tropical Diseases - Latin America and the Caribbean*. Neglected Tropical Diseases. Springer, Vienna. doi: 10.1007/978-3-7091-1422-3_5.

Ross R., Smyth S. 1897. On some peculiar pigmented cells found in two mosquitos fed on malarial blood. *The British Medical Journal* 2 (1929): 1786-1788. <http://www.jstor.org/stable/20252729>

Rossi G. C. 2015. Annotated checklist, distribution, and taxonomic bibliography of the mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) of Argentina. *Check List* 11(4): 1712.

Sabattini M. S., Avilés M. G., Monath J. C. 1998. Historical, epidemiological and ecological aspects of arboviruses in Argentina: Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae. En: Trassavossos da Rosa, A. P. A., Vasconcelos, P. F. C. Trassavossos da Rosa, J. F. S. (eds.). *An Overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries*. Ins. E. Chagas. Belén.

Sabattini M. S., Monath J. C., Mitchel J., Daffner G. S., Bowen R., Pauli R., Contigiani M. S. 1985. Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. I. Historical aspects and description of study sites. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34 (5): 937-944.

Sanad M., Sun J. S., Shamseldean M. S., Wang Y., Gaugler R. 2017. Superparasitism and population regulation of the mosquito-parasitic mermithid nematodes *Romanomermis iyengari* and *Strelkovimermis spiculatus*. *Journal of Nematology* 49 (3): 316-320.

Santamarina Mijares A., Pérez Pacheco M. C. R. 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.

Seccacini E., Lucia A., Zerba E., Licastro S., Masuh H. 2008. *Aedes aegypti* resistance to temephos in Argentina. *Journal of the American Mosquito Control Association* 24 (4): 608-609.

Service M. W. 2000. *Medical Entomology for Students*. Cambridge University Press, Cambridge.

Sih A. 1986. Antipredator responses and the perception of danger by mosquito larvae. *Ecology* 67 (2): 434-441.

Silverman J. M., Bell W. 1979. The role of vertical and horizontal object orientation in mate-finding and predator-avoidance by the american Cockroach. *Animal Behaviour* 27 (3): 652-657.

Simón F., Siles-Lucal M., Morchón R., González-Miguel J., Mellado I., Carretón E., Montoya-Alonso J. A. 2012. Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clinical Microbiology Reviews* 25 (3): 507-543.

Stamp N. E. 1981. Behavior of parasitized aposematic caterpillars: advantageous to the parasitoid or the host? *The American Naturalist* 118 (5): 715-725.

Stein M., Santana M., Galindo L. M., Etchepare E., Willener J. A., Almirón W. R. 2016. Culicidae (Diptera) community structure, spatial and temporal distribution in three environments of the province of Chaco, Argentina. *Acta Tropica* 156 (1): 57-67.

Tang H. 2009. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. *Fly* 3 (1): 105-111. doi: 10.4161/fly.3.1.7747.

Tato F. 1998. *Bases metodológicas del ensayo clínico*. Universidade de Santiago de Compostela. Servicio de Publicacións e Intercambio Científico.

Tauro L. B., Ludueña Almeida F., Contigiani M. S. 2009. First detection of human infection by Cache Valley and Kairi viruses (Orthobunyavirus) in Argentina. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103 (2): 197-199.

Tauro L. B., Batallán G., Rivarola M. E., Visintin A. M., Berrón C., Costa Sousa E. Jr., Díaz L. A., Almirón W. R., Nunes M., Contigiani M. 2015. Detection of Orthobunyavirus in mosquitoes collected in Argentina: Orthobunyavirus in Argentina. *Medical and Veterinary Entomology* 29 (3): 338-343. doi: 10.1111/mve.12121.

Theobald F. V. 1901. A monograph of the Culicidae of the world. Anopheline. W. Clowes and sons, British Museum *et al.*, Belgium.

Theobald F. V. 1905. Genera *Insectorum*- Diptera, Fam. Culicidae. W. Clowes and sons, British Museum *et al.*, Belgium.

Theobald F. V. 1910. A monograph of the Culicidae subfamily Anophelinae. W. Clowes and sons, British Museum *et al.*, Belgium.

Thomas F., Adamo S., Moore J. 2005. Parasitic manipulation: where are we and where should we go? Behavioural Processes 68 (3): 185-199.

Vance S. A. 1996. The effect of the mermithid parasite *Gasteromermis* sp. (Nematoda: Mermithidae) on the drift behaviour of its mayfly host, *Baetis bicaudatus* (Ephemeroptera: Baetidae): a trade-off between avoiding predators and locating food. Canadian Journal of Zoology 74 (10): 1907-1913. doi: 10.1139/z96-215.

Vance S. A., Peckarsky B. L. 1997. The effect of mermithid parasitism on predation of nymphal *Baetis bicaudatus* (Ephemeroptera) by invertebrates. Oecologia 110 (1): 147-152.

Vezzani D., Carbajo A. E. 2008. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: current knowledge and future directions. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 103 (1): 66-74.

Vezzani D., Eiras D. F., Wisnivesky C. 2006. Dirofilariasis in Argentina: Historical review and first report of *Dirofilaria immitis* in a natural mosquito population. Veterinary Parasitology 136 (3/4): 259-273.

Wang Y., Lutfi Z., Dong L., Suman D. S., Sanad M., Gaugler, R. 2012. Host cues induce egg hatching and pre-parasitic foraging behaviour in the mosquito parasitic nematode, *Strelkovimermis spiculatus*. International Journal for Parasitology 42 (10): 881-886.

Williams D. D. 2006. *The biology of temporary water*. Oxford University Press. London.

Wise de Valdez M. R. 2006. Parasitoid-induced behavioral alterations of *Aedes aegypti* mosquito larvae infected with mermithid nematodes (Nematoda: Mermithidae). Journal of Vector Ecology 31 (2): 344-354.

Wise de Valdez M. 2007. Predator avoidance behavior of *Aedes aegypti* mosquito larvae infected with mermithid nematodes (Nematoda: Mermithidae). *Journal of Vector Ecology* 32 (1): 150-153.

Yassine H., Kamareddine L., Osta M. A. 2012. The mosquito melanization response is implicated in defense against the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *PLoS Pathogens* 8 (11): e1003029. doi:10.1371/journal.ppat.1003029.

Zaidenberg M. O. 2015. *The path to Malaria elimination in Argentina*. LAP Lambert Academic Publishing, Saarbrücken, Deutschland/Germany.