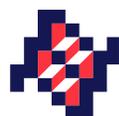




Cría de **mosquitos *Culicidae*** y **evaluación de insecticidas** de uso en **salud pública**

Rogelio Danis Lozano | Fabián Correa Morales

EDITORES



Instituto Nacional
de Salud Pública

Cría de mosquitos *Culicidae* y evaluación
de insecticidas de uso en salud pública

Rogelio Danis Lozano
Fabián Correa Morales
EDITORES

Cría de mosquitos *Culicidae* y evaluación de insecticidas de uso en salud pública



Instituto Nacional
de Salud Pública

Cría de mosquitos *Culicidae* y evaluación de insecticidas de uso en salud pública

Primera edición, 2021

D.R.© Instituto Nacional de Salud Pública
Av. Universidad 655,
Santa María Ahuacatlán
62100 Cuernavaca, Morelos, México

Impreso y hecho en México
Printed and made in Mexico

ISBN: 978-607-511-217-6

Coordinación editorial: Carlos Oropeza Abúndez
Edición: Francisco Reveles, Yunuen Gómez
Diseño y formación: Andrea Montiel Bautista
Fotografías: Cuauhtémoc Villarreal T.
Dibujos: Jana C. Ríos Delgado

Citación sugerida

Danis Lozano R, Correa Morales F. Cría de mosquitos *Culicidae* y evaluación de insecticidas de uso en salud pública. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2021.

Contenido

Sección I	Manual de procedimientos para la cría de aedinos y anophelinos en condiciones de insectario	9
Prefacio		11
Procedimientos	1. Procedimientos estandarizados para la cría de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Ae. albopictus</i>	13
	2. Procedimientos estandarizados para la cría de <i>Anopheles albimanus</i>	19
	3. Procedimientos estandarizados para la cría de <i>Anopheles pseudopunctipennis</i>	23
	4. Procedimientos estandarizados para la cría de <i>Anopheles darlingi</i> mediante copulación natural	25
	5. Procedimientos para la estimulación de apareamiento natural en <i>Anopheles</i> spp.	29
Apéndice	I. Procedimientos estandarizados para la colecta de mosquitos	35
	II. Guía rápida para el montaje de un insectario	40
	III. Buenas prácticas de laboratorio aplicadas al insectario	42
	IV. Procedimientos estandarizados para el sexado de pupas	44
	V. Procedimientos estandarizados para la alimentación sanguínea de mosquitos	46
	VI. Control de calidad de los mosquitos del insectario	48
Glosario		52

Sección II	Procedimientos normalizados de operación para evaluación de insecticidas para uso en salud pública	55
Introducción		57
Capítulos		
	1. Prueba de eficacia biológica de adulticidas PRUEBAS LINEALES	59
	2. Prueba de eficacia biológica de adulticidas PRUEBAS CON OBSTÁCULOS	71
	3. Prueba de eficacia biológica de adulticidas PRUEBAS DE CONTACTO/PARED	81
	4. Prueba de eficacia biológica de adulticidas PRUEBAS DE CONTACTO/PARED para adulticidas incorporados en mosquiteros de cama	91
	5. Prueba de eficacia biológica de larvicidas MORTALIDAD AGUDA. EFECTO RESIDUAL/INHIBICIÓN DE LA EMERGENCIA	97
Apéndice	I	107
	II	111
Glosario		112

Sección I

Manual de procedimientos para la cría de *aedinos* y *anophelinos* en condiciones de insectario

Cuauhtémoc Villarreal Treviño, Jana Celina Ríos Delgado,
Kenia Mayela Valdez Delgado, José Asunción Nettel Cruz
y Federico Alonso Zumaya Estrada

Prefacio

La necesidad de contar con material biológico óptimo para fines de investigación básica o aplicada, en el campo o laboratorio, justifica la cría y mantenimiento de colonias en condiciones de insectario. En el insectario del Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP)/INSP, ubicado en Tapachula, Chiapas, se mantienen colonias de insectos transmisores de enfermedades que representan un problema para la salud pública. El CRISP —anteriormente CIP (Centro de Investigación de Paludismo)— fue fundado hace 30 años, correspondientes a su experiencia en el establecimiento de colonias y cría de mosquitos.

Se han colonizado diversas especies de mosquitos con fines de investigación, algunas de ellas consideradas difíciles de establecer mediante cópula natural, como el caso de aquellas que transmiten malaria: *Anopheles albimanus*, *An. pseudopunctipennis* y *An. darlingi*. Asimismo, se ha establecido la cría de los vectores de Dengue, Zika y Chikungunya, *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus*, para realizar evaluaciones de eficacia de insecticidas a utilizarse en Salud Pública, siendo el CRISP, un Centro Evaluador reconocido por el CENAPRECE/Secretaría de Salud en México.

Esta guía es el resultado de 30 años de experiencia de investigación sobre la cría de los vectores de dengue y malaria en el sur del país, así como de colaboraciones realizadas en México y en el extranjero; cuyo objetivo es lograr una homogeneidad, en términos de la producción en masa y desarrollo sincronizado, al mismo tiempo mantener una producción constante de material biológico en condiciones óptimas de cantidad y calidad. Consideramos que esta contribución facilita la implementación y operación de insectarios de una manera práctica, económica y sencilla; de modo tal, que los grupos operativos nacionales e internacionales fortalezcan las destrezas necesarias para producir mosquitos de importancia médica en cada una de las regiones de México y Latinoamérica.

Procedimientos estandarizados para la cría de *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus*

Introducción

Aedes (Stegomyia) aegypti es un mosquito cosmopolita que se ha extendido ampliamente en el mundo, especialmente entre las latitudes 35°N y 35°S, donde persiste como el vector principal de arbovirus tales como dengue, chikungunya y zika, en zonas urbanas. En los años 90's, en México se introdujo el mosquito tigre asiático, *Ae. albopictus*, en el territorio norte y gradualmente se ha extendido por todo el país, contribuyendo en la transmisión de arbovirus.

En el insectario del Centro Regional de Investigación en Salud Pública/Instituto Nacional de Salud Pública (CRISP/INSP) se mantienen poblaciones adaptadas de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, con el fin de realizar investigación en el área de control de vectores, esto incluye la realización de bioensayos y pruebas de campo para evaluar la efectividad de insecticidas y formas de aplicación. Estas pruebas servirán de base en los programas de control para reducir las poblaciones de los vectores y así evitar la transmisión de arbovirus.

En este capítulo se presenta cómo establecer la cría de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, indicando los procedimientos de manejo en cada fase de desarrollo y, al mismo tiempo, las condiciones ambientales con que debe contar un insectario. Asimismo, presentamos algunas recomendaciones prácticas para llevar a cabo la vigilancia entomológica y la colecta de material biológico.



Figura 1 Hembra de *Aedes aegypti* ingiriendo sangre.

Manipulación de huevos

Las hembras de *Aedes aegypti* son anautógenas, es decir que necesitan obligatoriamente una o varias alimentaciones sanguíneas para el desarrollo de los huevos.¹ Después de cumplido el tiempo de la ovogénesis, las hembras buscan el lugar apropiado para oviponer. Para la oviposición en el insectario, se recomienda colocar uno o más recipientes de color negro que pueden ser de tamaño variable, con el único requisito de que sea agua limpia, sin cloro, para evitar daño a los huevos. Se recomienda utilizar un filtro estándar (figura 2).

Para obtener mayor cantidad de huevos y fácil manipulación, se coloca una tira de papel filtro en la parte interior de la ovitrampa o recipiente de oviposición de 5 cm de ancho y sumergida en el agua por 2 cm, de tal forma que la tira se mantiene húmeda en su totalidad y es en este espacio húmedo donde la hembra coloca los huevos (figura 2).

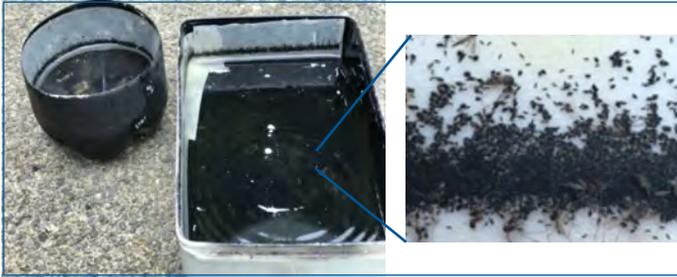


Figura 2 Recipientes de oviposición con papel filtro en su interior.

Método para el desarrollo del embrión

La embriogénesis inicia en el momento de la ovipostura, teniendo un periodo embrionario de 48 h a 56 h, dependiendo de la temperatura ambiental,¹ derivado de lo anterior, los huevos de las ovitrampas o de los recipientes de oviposición, deberán mantenerse al menos por 48 h a temperatura ambiental, en contacto con una superficie húmeda (papel filtro) para que el embrión se desarrolle adecuadamente. Una vez completo el periodo embrionario, las tiras con los huevos se colocan en una charola limpia y seca, para el proceso de secado. Este proceso debe ser gradual a temperatura ambiente, así las tiras se secan lentamente. Después de dos días de secado, las tiras con los huevos se almacenan en bolsa de papel, permaneciendo en estado de diapausa o latencia de ocho meses hasta por un año si son huevos de *Aedes aegypti*^{1,2} y de 2 a 4 meses en el caso de *Ae. albopictus*; sin embargo, no se recomienda mantenerlos por mucho tiempo, porque con el paso de los meses los huevos pierden viabilidad, por lo que se recomienda re-sembrarlos cada tres a seis meses.

Se recomienda almacenar las tiras de papel filtro en bolsas de papel, más que las de plástico y colocarlas en un ambiente de temperatura controlada oscilando en $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Se debe tener cuidado que los huevos no sean dañados por otros insectos como hormigas, cucarachas o piojos de los libros (Psocópteros).

Para sembrar la cantidad de huevos deseada, se pueden realizar estimaciones sobre el número de huevos en la

tira, para esto se coloca la tira de huevos al microscopio y se cuenta por cm, se promedia el conteo de 3 cm y finalmente se estima el total de huevos midiendo la longitud total de la tira. Otra forma para estandarizar el método de sembrado de huevos es mediante el peso de 1 gr de huevos, en él se retiran los huevos secos de la tira utilizando un pincel de cerdas suaves sobre papel encerado y se colectan para pesarlos, esto se debe hacer con mucho cuidado para no dañar los huevos. De esta forma se cuenta con una medida estándar a la hora de sembrar.

Eclosión de huevos

Las tiras de papel filtro con los huevos embrionados se colocan en una charola y se humedecen por espacio de 2h a temperatura ambiente, previa a sumergirlos totalmente. Se recomienda que la temperatura del agua sea $\approx 30^\circ\text{C}$, para mayor éxito en la eclosión de las larvas. Los huevos de *Ae. aegypti* eclosionan de 1h hasta 2 días, para *Ae. albopictus* pueden tardar de 1h hasta 4 a 5 días.

Manipulación de larvas y pupas

Las larvas son exclusivamente acuáticas, muy activas desde la emergencia del huevo. Esta etapa constituye el periodo de alimentación y crecimiento de la especie (figura 3). El desarrollo larval comprende cuatro estadios que se han descrito como L1, L2, L3 y L4 (figura 4). Los primeros estadios en general se desarrollan rápido, mientras que el cuarto demora más tiempo, durante el cual la larva aumenta de tamaño y peso. A una temperatura ambiental de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, el ciclo larvario promedio es de 12.5 días con rangos de 8 a 15 días. El primer estadio larval es la fase en que eclosiona del huevo, puede identificarse principalmente por la presencia de una proyección en la parte superior de la cabeza denominado “diente de eclosión” Los estadios posteriores se identifican por su tamaño y aspecto general (figura 4).



Figura 3 Larvas de 4º estadio de *Aedes aegypti*.

Sobre las charolas y densidad larvaria

Para tener una cría larvaria en óptimas condiciones es importante considerar la densidad larvaria por charola, de acuerdo a la disponibilidad de tamaño de las charolas. Para la cría de larvas se recomienda utilizar charolas blancas de 61X40X6 cm (figura 5) agregando 4 lt de agua filtrada obteniendo una capa de agua de 2 cm, este tamaño de charola puede mantener 4 000 larvas, equivalente a una densidad de 1 larva/ml.



Figura 5 Charolas utilizadas en la cría de larvas de mosquitos de importancia médica.

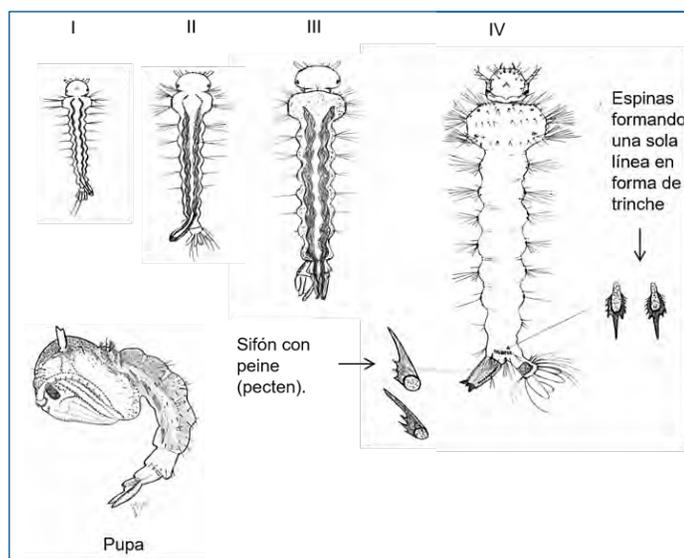


Figura 4 Cuatro estadios de desarrollo (I-IV) y pupa de *Aedes aegypti*.

Las colonias de *Aedes aegypti* se mantienen bajo condiciones controladas a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, a una humedad relativa de $60 \pm 10\%$, y fotoperiodo de 12:12 (L:O) h. Es necesario que el cuarto de cría de larvas no tenga ventanas por donde pueda entrar luz de alguna lámpara durante la noche, ya que eso puede alterar el crecimiento larval. Se debe contar con una iluminación entre 300 a 600 luxes que incidan sobre las charolas, preferentemente utilizando focos con luz de día. También se recomienda poner luz en la pared para evitar lugares

oscuros que alteran el desarrollo normal de las larvas.

Para alimentar las larvas se utiliza alimento de ratón (Laboratory Rodent Diet 5001 LabDiet®) molido y tamizado en una malla 35 (abertura de 500 micrómetros) esterilizado (cocido) a $110^\circ\text{C}/15\text{min}$. La mayoría de las dietas tienen un alto contenido de proteínas y carbohidratos, así como una baja proporción de grasas; además de vitaminas del complejo B y minerales. Este alimento a base de alimento de ratón de laboratorio, presenta la siguiente tabla nutricional:

• Proteína cruda	23%
• Grasa cruda	4.5%
• Fibra cruda	6.0%
• Minerales agregados	2.5%
• Cenizas	2.5%

El alimento para larvas se deposita directamente en el contenedor de larvas, con la mano protegida con guantes para evitar la contaminación o con una cuchara de plástico calibrada para esta cantidad de alimento. El alimento debe permanecer en refrigeración a -4°C para alargar su vida útil.

Alimentación de larvas

La alimentación larval es muy importante para la producción de mosquitos, ésta debe ser adecuada y dependiente de la cantidad y tamaño de las larvas, para el tamaño de charolas 61 X 40 X 6 cm (figura 5. Charolas) y bajo estas densidades larvarias se recomienda agregar: 1, 1.5, 1.5 y 2 g en los estadios 1º, 2º, 3º y 4º, respectivamente. Se proporcionará la cantidad indicada ya que el exceso de alimento puede ocasionar mortalidad, debido a la formación de una película grasosa sobre la superficie del agua. Por otra parte, la escasez de alimento ocasiona una desnutrición en las larvas y por lo tanto, se alarga el tiempo de desarrollo larvario, teniendo como consecuencia la producción de adultos pequeños.

La pupa, a diferencia de la larva, no se alimenta y es exclusivamente una fase de metamorfosis donde se lleva a cabo una histólisis e histogénesis intensa, que da lugar a la fase adulta. Tiene forma de “coma” cuando se observa posada en la película de agua superficial. En ella destaca la presencia de dos proyecciones originadas del tórax a manera de cuernos que son las trompetas ventiladoras por donde obtiene el aire atmosférico para la respiración (figura 4). Esta etapa del ciclo de vida dura aproximadamente de dos a tres días.

En el insectario las pupas se colectan diariamente utilizando un gotero o bomba de succión y se colocan en un recipiente de plástico, cuyo tamaño dependerá del número de pupas colectadas; no se recomienda conglomerar muchas pupas en el recipiente porque puede ocasionar mortalidad a las mismas, preferentemente que cubra un 50% de la superficie, tampoco se recomienda mezclar pupas de varios días, porque la exuvia de las pupas anteriores puede asfixiar a las nuevas pupas. Se recomienda que en todo el proceso, desde el huevo hasta la pupa, se mantenga una temperatura constante de agua, ya que cambios bruscos en ésta puede causar mortalidad.

Estas pupas se pueden introducir directamente a una jaula, pero también se puede cubrir el recipiente con tela tricot y ligas para evitar la liberación de los adultos. Los machos y hembras a nivel de pupa pueden separarse por el tamaño corporal, ya que los machos normalmente son más pequeños que las hembras (ver método de separación de sexos en apéndice IV).

Otra forma de separación de sexos es mediante la observación al microscopio de la terminalia genital localizada en la parte final-central del abdomen de la pupa, de

las paletas natatorias, el macho posee una proyección en forma triangular que acaba en un punto ángulo y en la hembra la proyección es redondeada (figura 4). Cuando la producción es muy alta, se recomienda utilizar un succionador por vacío (figura 6).

Manipulación de adultos. Manejo de hembras y machos

El mosquito adulto representa la fase aérea y final del ciclo de vida; también es la fase reproductiva del insecto, adaptada para el vuelo y la dispersión. En la naturaleza, el mosquito adulto recién emergido permanece las primeras 24 h posado sobre las superficies verticales sombreadas más cercanas al criadero, para permitir el endurecimiento del exoesqueleto y de las alas, y en el caso de los machos, la rotación de la terminalia genital en 180°. Después inicia un periodo de vuelos cortos en busca de flores para obtener energía del néctar y luego inicia la búsqueda del sexo opuesto para copular.¹

Las hembras y machos normalmente viven dentro de las casas, y es ahí donde la hembra es estimulada a ingerir sangre; sin embargo, otro estímulo igual de importante en su sobrevivencia es el de ser inseminada. Estas dos actividades: cópula y alimentación, a menudo ocurren simultáneamente, ya que los machos son atraídos por los mismos huéspedes vertebrados que las hembras pero con el fin de ir al encuentro de las hembras e inseminarlas. Este comportamiento generalmente se realiza durante el vuelo,



Figura 6 Método para manejar adultos mediante bomba de succión.

pero en algunas ocasiones se lleva a cabo en una superficie vertical u horizontal. Al aparearse, el macho sujeta el ápice del abdomen de la hembra con su terminalia. Las hembras poseen tres espermatecas; es decir, el lugar donde guardan el espermatozoide para toda la vida. Una inseminación es suficiente para fecundar todos los huevos que la hembra desarrolle durante su vida.¹

Los machos se alimentan del néctar de las flores; las hembras en la naturaleza raramente se alimentan de azúcares, preferentemente se alimentan de sangre humana o animales domésticos como perros, aves de corral, etc., debido a que la sangre es útil para el desarrollo de la ovogénesis.³ Una vez que la hembra ingiere sangre se inicia el ciclo gonotrófico o formación de los huevos, que tarda de 48 a 72 h dependiendo de la temperatura ambiental. Posteriormente busca recipientes con agua para oviponer. Después de la oviposición, la hembra reanuda la conducta de búsqueda de otra alimentación sanguínea, para el siguiente grupo de huevos. El mosquito *Aedes aegypti* posee la característica de alimentaciones múltiples durante su ciclo gonotrófico, es decir que puede alimentarse y poner huevos diariamente.⁴

En condiciones de insectario, los machos y hembras copulan con mayor facilidad en espacios pequeños como una jaula chica de 30x30x30 cm, para esto se introducen los mosquitos en la jaula y se mantienen ahí por dos o tres días de modo que se asegure el apareo e inseminación de las hembras. Con una proporción de 1:1 machos y hembras en un número máximo de 2000 adultos, se asegura una adecuada reproducción y una adecuada producción de huevos. Se recomienda mantener al menos mil hembras para producir tiras repletas de huevos.

Sobre las jaulas se deberán colocar algodones empapados con una solución de agua azucarada al 5% o con miel al 1%. Es vital que se revisen los algodones diariamente para mantenerlos húmedos, pues no tener esta fuente de hidratación y soporte energético ocasiona, inmediatamente, la muerte de los mosquitos. Debe señalarse que mosquitos deberán mantener un riguroso control de calidad (apéndice VI).

Alimentación sanguínea

Generalmente, después de cada alimentación sanguínea, se desarrolla un lote de huevos. Sin embargo, el *Ae. aegypti* con frecuencia se alimenta con sangre más de una vez entre cada postura, especialmente si la hembra

es interrumpida antes de estar completamente llena de sangre; por consiguiente, las alimentaciones sanguíneas escasas producen pocos huevos por lote y una alimentación muy reducida no los produce.²

Para la alimentación de hembras en condiciones de insectario, se utilizan varios métodos; en la alimentación con conejo, se introducirá en la jaula de reproducción un conejo rasurado en la región dorsal y se inmoviliza amarrándole las patas por 15 min. Para agilizar el proceso de alimentación, a las hembras de *Ae. aegypti* se les retira el algodón con azúcar una hora previa y así se acorta el tiempo de alimentación. Para asegurar la alimentación de hembras nulíparas, se aconseja alimentar nuevamente al siguiente día. Si se sigue esta metodología, se deberán consultar las normas para el establecimiento de un Bioterio en cada país. Asimismo, se recomienda seguir el protocolo de alimentación artificial contenido en el apéndice II.

Referencias

1. Christophers S. *Aedes aegypti* (L) the Yellow Fever Mosquito: its Life History, Bionomics and Structure. 1960. Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19602901825>
2. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. TDR (for Research on Diseases of Poverty). Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. La Paz, Bolivia: OPS/OMS, 2009. Disponible en: https://www.who.int/denguecontrol/resources/dengue_guidelines_2009/es/
3. Service MW. Mosquito Ecology. Field sampling methods, 2a Ed. Elsevier Applied Science, 1993.
4. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Guía de colecta entomológica. México: INDRE, 2009. Disponible en: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/guia_colecta_entomologica_IndRE.pdf
5. Gerberg EJ, Barnard DR, Ward RA. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. AMCA Bulletin. 1994(5):53-56.
6. Bargielowski I, Nimmo D, Alphey L, Koella JC. Comparison of Life History Characteristics of the Genetically Modified OX513A Line and a Wild Type Strain of *Aedes aegypti*. PLoS ONE. 2011;6(6): e20699. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020699>
7. Scott TW, Clark GG, Lorenz LH, Amerasinghe PH, Reiter P, Edman JD. Detection of multiple blood feeding in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histologic technique. Journal of Medical Entomology. 1993;30:94-99.

Procedimientos estandarizados para la cría de *Anopheles albimanus*

Introducción

El mosquito *Anopheles albimanus* es el principal vector de malaria en la planicie costera de los océanos Pacífico y Atlántico, así como en la Selva Lacandona, Chiapas, México (figura 7).^{1,2} Una de sus cualidades es que se reproduce en altas cantidades y tiene preferencia por alimentarse de ganado vacuno, pero también de humanos (figura 7). En México, *Anopheles albimanus* se estableció en 1987 en el insectario del CRISP y desde entonces se han aplicado diferentes técnicas con el fin de hacer las prácticas de cría más efectivas y eficientes. Dentro de los principales logros de tener una colonia se encuentra la detección de fenotipos pupales, que en estado adulto presentan diferente susceptibilidad a *Plasmodium vivax*.^{3,4} A continuación se describen las principales prácticas para la cría de esta especie en el laboratorio.^{5,6}

Manipulación de huevos

Los recipientes de oviposición se sacarán de la jaula y se pueden introducir a una incubadora a 30°C para la eclosión, ya que en caso de esta especie no es posible guardar huevos embrionados. En caso de no contar con incubadora, los huevos pueden permanecer a temperatura ambiental de 25±1°C. El periodo embrionario tarda 72 h y para asegurar un óptimo desarrollo embrionario se deben man-



Figura 7 *Anopheles albimanus* ingiriendo sangre.

tener las tiras con los huevos en un recipiente con agua, sin que el agua cubra los huevos, solo mantener húmeda la tira de papel. Las larvas eclosionadas se siembran en charolas limpias, sin agregar la carcasa del huevo.

Manipulación de larvas y pupas

Una vez desarrollado el embrión dentro del huevo, si hay suficiente agua, la larva eclosionará e iniciará el desarrollo larvario pasando por cuatro estadios o instar hasta llegar a la etapa de pupa. La longitud del periodo larvario dependerá de varios factores como el tipo de criadero, la densidad de las larvas, calidad del alimento y de la temperatura del agua, la cual a su vez depende de la temperatura ambiental. En promedio el periodo larvario es de 6 a 12 días a $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

Para la cría de larvas se recomienda utilizar charolas blancas de 61x40x6 cm (figura 5), agregando agua filtrada hasta tener una columna de agua de 2 cm. Este tamaño de charola puede mantener ≈ 3000 larvas, equivalente a tener una densidad de 1 larva/cm².

Alimentación larvaria

Las larvas se alimentan con alimento de ratón (Laboratory Rodent Diet 5001 Lab Diet®) molido y tamizado en una malla 100, esterilizado (cocido) por $110^\circ\text{C}/15$ min. Las larvas se alimentan agregando de 30 a 40 mg sobre la superficie del agua con una frecuencia de 2 a 3 veces al día dependiendo de las necesidades de las larvas.

Las pupas se colectan diariamente utilizando un gotero o bomba de succión y se colocan en otro recipiente de plástico, cuyo tamaño dependerá del número de pupas colectadas. Normalmente se utilizan recipientes redondos con un diámetro de 20cm y una altura de 15cm. La cantidad de pupas no debe abarcar más del 75% de la superficie del agua, ya que la aglomeración impide la adecuada respiración de las pupas.

Manipulación de adultos. Manejo de hembras y machos

Para una colonia adaptada al laboratorio se pueden seguir las siguientes recomendaciones: Los adultos recién emergidos se introducen en jaulas metálicas de 45x45x45cm con densidad de 3 000 adultos (figura 8). Pueden utilizarse también jaulas más pequeñas de 30x30x30cm para una

densidad de 2000 adultos, siempre en una proporción de 1:1 hembras-machos. Se deberá manipular apropiadamente las jaulas con los mosquitos y se recomienda colocar en la base de la jaula, papel estraza para facilitar la limpieza de la misma. No cubrir las jaulas con toallas húmedas, este puede influenciar negativamente en el proceso de preparación de los adultos al momento de la cópula.

Se coloca algodón con agua azucarada al 5% o con miel al 1%, permanentemente sobre la jaula de adultos, y cada tercer día se cambia para mantener vivos a los machos y hembras. Se deberá manipular el algodón con solución azucarada con las manos limpias (sin alcohol, perfume, crema de manos, etc.) caso contrario utilizar guantes. Se recomienda revisar el algodón cada 24 horas, si éste cambia de color o textura se deberá cambiar inmediatamente. Después de mantener los adultos durante cinco días, con el objetivo que las hembras sean inseminadas, al sexto día se pueden alimentar con conejo, introduciendo la parte dorsal



Figura 8 Jaula metálica de para el mantenimiento de adultos.

del animal en el interior de la jaula, previamente rasurado el pelo, se recomienda seguir el protocolo de alimentación artificial (apéndice V). Para agilizar el proceso de alimentación, a las hembras de mosquitos se les retira el algodón 3 h previas a la alimentación sanguínea. Posteriormente se esperan 48 h y se colocan uno o varios recipientes de oviposición de color blanco, que pueden ser redondos con un diámetro de 20 cm y una altura de 15 cm, con agua limpia y papel filtro en la parte interior. Se recomienda que el papel filtro tenga un ancho de 5 cm y deberá sumergirse 2 cm aproximadamente.

Cuando se inicia el establecimiento de una colonia de *An. albimanus* normalmente no se tiene problemas para la cópula e inseminación de las hembras, ya que existen grupos poblaciones de esta especie que requieren de estímulos externos como cambios en temperatura y luz, para ello se pueden seguir las recomendaciones mencionadas en la Sección V.

Referencias

1. Zimmerman RH. Ecology of malaria vectors in the Americas and future direction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87(Suppl.3):371–83.
2. Faran ME. Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXXIV. A revision of the albimanus section of the subgenus Nyssorhynchus of Anopheles. *Contrib Am Entomol Inst*. 1980;15:1–215.
3. Chan AS, Rodríguez MH, Torres JA, Rodríguez MC, Villarreal C. Susceptibility of three laboratory strains of Anopheles albimanus (Diptera: Culicidae) to coindigenous Plasmodium vivax in southern Mexico. *J Med Entomol*. 1994;31(3):400-3.
4. Gonzalez-Ceron L., Rodríguez MH, Santillan FV, Hernandez JE, Wirtz RA. Susceptibility of three laboratory strains of Anopheles albimanus (Diptera: Culicidae) to coindigenous Plasmodium vivax circumsporozoite protein phenotypes in southern Mexico. *J Med Entomol*. 2000. 37(3):331-4.
5. Gerberg EJ, Barnard DR, Ward RA. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. *AMCA Bulletin*. 1994(5):53-56.
6. World Health Organization. Division of Malaria and Other Parasitic Diseases. Manual on practical entomology in malaria. Part 1. World Health Organization, 1995. Disponible en: <http://www.who.int/iris/handle/10665/42481>. Accessed 23 Julio 2019.
7. World Health Organization. Division of Malaria and Other Parasitic Diseases. Manual on practical entomology in malaria. Part II. 1995. <http://www.who.int/iris/handle/10665/42481>. Accessed 23 Julio 2019
8. Rodríguez MH, Ulloa-García A, Ramsey JW, Eds. Manual para la vigilancia y control del paludismo en Mesoamérica. 1ed. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2008.

Procedimientos estandarizados para la cría de *Anopheles pseudopunctipennis*

Introducción

El mosquito *An. pseudopunctipennis* es el vector primario de malaria en elevaciones por encima de los 500 msnm, en México (figura 9).^{1,2} En 1989 en el CRISP, anteriormente llamado CIP (Centro de Investigación de Paludismo), derivado de la necesidad de contar con material biológico de *An. pseudopunctipennis* para realizar diferentes investigaciones, se planteó la necesidad de tener una colonia adaptada a las condiciones de insectario. En ese entonces, en México, no se contaba con ninguna colonia de esta especie, y en el ámbito mundial solo se tenía reporte de una colonia en Panamá.^{3,4} El problema principal era que los mosquitos no copulaban en espacio restringido de una jaula de 60x60x60 cm. Al aplicar la metodología usada para la población de Panamá, los mosquitos mexicanos no reaccionaron satisfactoriamente; debido a ello, se iniciaron estudios para conocer los factores adecuados para estimular el comportamiento sexual de esta especie en una población de México. Finalmente, en 1998 se logró establecer por primera vez a las condiciones de insectario del CRISP.² Aquí se describe el método empleado.

Manipulación de huevos

Las hembras y machos recién emergidos se estimulan sexualmente (ver sección V). Una vez que las hembras han



Figura 9 *Anopheles pseudopunctipennis* ingiriendo sangre.

sido inseminadas, se le proporciona una o dos alimentaciones sanguíneas de acuerdo con los protocolos establecidos (ver apéndice V). El ciclo gonotrófico tiene una duración de 72 h a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Los recipientes de oviposición son variables en forma, se recomienda que sean charolas rectangulares de 20x10x5 cm cubiertas en su

interior por papel filtro, asimismo, estas charolas deberán ser oscuras. Una vez que las hembras colocan los huevos en los recipientes de oviposición, éstos pueden ser utilizados para obtener la siguiente generación. Igual que en el caso de *Anopheles albimanus*, para esta especie no se pueden guardar los huevos embrionados. El periodo embrionario tarda ≈ 72 h, a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Para asegurar un óptimo desarrollo embrionario, se mantienen las tiras con los huevos en el recipiente con agua, sin que el agua los cubra, hasta la eclosión de las larvas.

Manipulación de larvas y pupas

Para la cría de larvas se recomienda utilizar charolas blancas de 61x40x6 cm (figura 5), agregando agua filtrada hasta tener una columna de agua de 2 cm. Este tamaño de charola puede mantener ≈ 3000 larvas, equivalente a tener una densidad de 1 larva/cm². A una temperatura ambiental de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, el ciclo larvario en promedio es de 10 días, con rangos de 8 a 16 días.

Alimentación larvaria

Las larvas se alimentan con alimento de ratón (Laboratory Rodent Diet 5001 LabDiet®) molido y tamizado en una malla 100, esterilizado (cocido) por $110^\circ\text{C}/15\text{min}$. Las larvas se alimentan agregando de 30 a 40 mg sobre la superficie del agua con una frecuencia de 2 a 3 veces al día dependiendo de las necesidades de las larvas.

Las pupas se colectan diariamente con una bomba de vacío o con un gotero de 5 ml, y se lleva un registro diario en una libreta. Las pupas se colocan en un recipiente de plástico conteniendo agua de las mismas charolas donde se criaron como larvas y se cubren con malla tricot, ajustándola con una cinta elástica. Entre 24 a 48 h después emergen los adultos y se liberan en la jaula metálica mediana de 45x45x45 cm. Cuando se obtengan alrededor de mil adultos entre machos y hembras, se puede dar inicio a la inducción de cópula. A las jaulas con los adultos se les coloca en la parte superior algodón saturado con una solución de azúcar al 10%, cambiando estos trozos de algodón cada tercer día.

Manipulación de adultos. Manejo de hembras y machos

La jaula donde se colocarán los adultos debe tener esencialmente un tamaño de 45x45x45 cm, colocando un máximo de 3000 mosquitos en una proporción 1:1 hembras-machos, donde se realizará la actividad de apareamiento (figura 8), en jaulas más pequeñas esta especie no copula adecuadamente. Se deberán mantener los mismos cuidados con las jaulas como los mencionados para *An. albimanus*. Los mosquitos se alimentan desde el primer día de emergencia con solución azucarada al 5% o miel al 1%. Esta solución debe ser embebida en pedazos de algodón colocados sobre las jaulas. Se deberá manipular los algodones con solución azucarada con las manos limpias (sin alcohol, perfume, crema de manos, etc.), en caso contrario utilizar guantes. Revisar los trozos de algodón cada 24 horas, si alguno presenta cambios de color o textura se deberá cambiar inmediatamente.

Referencias

1. Villarreal TC, Arredondo JI, Rodríguez MH. Bionomía de los principales vectores del paludismo en México. En: Kumate J, Palomo AM, eds. A cien años del descubrimiento de Ross. El paludismo en México. México: El Colegio Nacional, 1998.
2. Villarreal TC, Arredondo JI, Rodríguez MH, A. Ulloa A. Colonization of *Anopheles pseudopunctipennis* from México. J Am Mosq Control Assoc. 1998. 14:369-372.
3. Manguin S, Roberts DR, Peyton EL, Fernandez-Salas I, Barreto M, Fernandez Loayza R, et al. Biochemical systematics and population genetic structure of *Anopheles pseudopunctipennis*, vector of malaria in Central and South America. Am J Trop Med Hyg. 1995;53:362-77.
4. Baerg DC. Colonization of *Anopheles pseudopunctipennis* in Panama. J Med Entomol. 1971;8(2):180-2.
5. Gerberg EJ, Barnard DR, Ward RA. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. AMCA Bulletin. 1994(5):53-56.

Procedimientos estandarizados para la cría de *Anopheles darlingi* mediante copulación natural

Introducción

Anopheles darlingi es el vector de malaria más eficiente en el Nuevo Mundo (figura 10).^{1,2} Muchos aspectos de bionomía y sobre la relación vector-parásito se desconocen por falta de una colonia adaptada a las condiciones de insectario.³ Existen reportes previos de colonización de esta especie,^{4,5} pero con la metodología reportada no se han podido reproducir. En el año 2000 se intentó, por primera vez, con



Figura 10 *Anopheles darlingi* ingiriendo sangre.

mosquitos procedentes de la Selva Lacandona, Chiapas, y se logró mantener por 9 meses en condiciones de insectario; sin embargo, no se pudo establecer definitivamente, debido a que no se logró superar el problema de la falta de oviposición de las hembras, pues éstas no contaban con los estímulos adecuados.⁶ En un segundo intento, se aplicaron los métodos aprendidos en México con una población de *An. darlingi* de la Selva Amazónica, Perú, con resultados satisfactorios, logrando superar los tres principales problemas: a) cría de las larvas adecuadamente, b) desarrollo de un método de estimulación sexual, c) la determinación de los estímulos para la oviposición de las hembras.³ La metodología para establecer y mantener una colonia de *An. darlingi* en condiciones de insectario se encuentra en las indicaciones de la sección V.

Manipulación de huevos

Después de transcurrir 48 h de la alimentación sanguínea (apéndice V) se colocan de 4 a 5 recipientes en el interior de las jaulas 60x60x60 cm (figura 8). Los recipientes deberán ser rigurosamente de color negro con agua filtrada y papel filtro en la parte interior. Para mejorar la ovipostura se pueden adicionar plantas acuáticas del área donde se capturaron las hembras o las larvas, como estimulante de oviposición.

Repetir la alimentación sanguínea de las hembras cada dos días, esto ayudará a la producción permanente de huevos dentro las jaulas. Los huevos deben mantenerse a temperatura ambiente de $30\pm 1^\circ\text{C}$ o si se cuenta con incubadora se podrán mantener a 30°C para uniformar el desarrollo embrionario. Igual que en el caso de *Anopheles albimanus*, para esta especie no se pueden guardar los huevos embrionados.

Manipulación de larvas y pupas

Se debe contar con agua limpia (filtrada) para la cría de las larvas. Las larvas recién eclosionadas se siembran en recipientes de plástico de $61\times 40\times 6$ cm, color claro, con 4 l de agua. Este tamaño de charola puede mantener ≈ 2000 larvas, equivalente a tener una densidad de 0.8 larvas/ cm^2 . A una temperatura ambiental de $29\pm 1^\circ\text{C}$, el ciclo larvario en promedio es de 10 días, con rangos de 8 a 16 días.

Las larvas se alimentan con alimento de ratón (Laboratory Rodent Diet 5001 (LabDiet®)) molido y tamizado en una malla 100, esterilizado (cocido) por $110^\circ\text{C}/15\text{min}$.

En caso de utilizar charolas más chicas se debe solamente aplicar las adecuaciones de acuerdo al tamaño de la charola y número de larvas, después se distribuye el alimento con la yema de los dedos sobre la superficie del agua hasta que este se disperse totalmente. El desarrollo larvario oscila entre los 8 a 12 días, a temperatura ambiental de

$29\pm 1^\circ\text{C}$. En caso que se retrase la pupación se debe analizar si el fotoperiodo esta alterado o si se mantiene una temperatura más baja.

También se debe evitar manipular las larvas con frecuencia para no ocasionar la muerte de las mismas. En caso de contaminación o mal olor del agua de las charolas, se deberá cambiar hasta el 80% del agua por limpia, pero nunca totalmente, ya que esto les puede ocasionar la muerte.

La colecta de las pupas se realiza diariamente por medio de una pipeta o gotero de plástico (5 ml) o usando una bomba de vacío, siempre con el debido cuidado para evitar dañar los especímenes. Se deben colocar las pupas con agua de las charolas de cría larvaria para después ubicarlas dentro de una jaula con malla para la emergencia de los adultos, registrando el número de individuos y las fechas de emergencia, tanto en las jaulas como en las bitácoras de registro. Las áreas de larvas y adultos deben estar separadas y aisladas por puertas de acceso.

Recomendaciones adicionales

Al iniciar el establecimiento de una colonia adaptada a las condiciones de insectario antes mencionadas, una buena práctica para estimular la oviposición es colocando plantas acuáticas flotantes sobre los recipientes de oviposición. Esto les sirve de reposo a las hembras grávidas y posiblemente liberen sustancias estimulantes de oviposición (figura 11).



Figura 11 Plantas acuáticas para estimular la oviposición (A) (B).

De igual manera, en los recipientes de cría de las larvas se pueden colocar plantas acuáticas para incrementar la superficie del área. Las especies de plantas a utilizar son aquellas propias de la región donde normalmente se encuentran las larvas de la especie a establecer en el laboratorio. Las plantas acuáticas se deben esterilizar con yodo (1%) o cultivarlas previamente en condiciones asépticas. Las plantas se pueden colocar durante todo el desarrollo larvario y retirarlas al momento de que inicia la fase de pupa.

Manipulación de adultos. Manejo de hembras y machos

La jaula donde se colocarán los adultos y donde se realizará la actividad de cópula debe tener esencialmente un tamaño de 60x60x60 cm, en jaulas más pequeñas *An. darlingi* no copula adecuadamente. Se alimentan los mosquitos desde el primer día de emergencia con solución azucarada al 5% o solución con miel al 1%. Esta solución debe ser embebida en pedazos de algodón y colocadas sobre las jaulas. Se deberá manipular los algodones con solución azucarada con las manos limpias (sin alcohol, perfume, crema de manos, etc.), en caso contrario utilizar guantes. Revisar los algodo-

nes cada 24 h, si éstos cambian de color o textura se deberán cambiar inmediatamente. Los cuidados que se brinden a las jaulas deben ser los mismos para las tres especies especies (*Anopheles albimanus*, *An. pseudopunctipennis* y *An. darlingi*).

Referencias

1. Hiwat H, Bretas G. Ecology of *Anopheles darlingi* root with respect to vector importance: a review. *Parasit Vectors*. 2011;4:177. doi:10.1186/1756-3305-4-177.
2. Vargas. El *Anopheles darlingi* Root, 1926 en México. *Revista del Instituto de Salubridad y enfermedades Tropicales*. 1946;7(4): 221-226.
3. Villarreal-Treviño C, Vásquez GM, López-Sifuentes VM, Escobedo-Vargas K, Huayanay-Repetto A, Linton YM, Flores-Mendoza C, Lescano AG, Stell FM. Establishment of a free-mating, long-standing and highly productive laboratory colony of *Anopheles darlingi* from the Peruvian Amazon. *Malar J*. 2015. 30;14:227. doi: 10.1186/s12936-015-0733-0.
4. Giglioli G. Laboratory colony of *Anopheles darlingi*. *J Natl Malar Soc*. 1947;6:159-64.
5. Bates M. The laboratory colonization of *Anopheles darlingi*. *J Natl Malar Soc*. 1947;6:155-8.
6. Gerberg EJ, Barnard DR, Ward RA. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. *AMCA Bulletin*. 1994(5):53-56.



Figura 12 Plantas acuáticas en las charolas de cría larvaria (A) y (B).

Procedimientos para la estimulación de apareamiento natural en *Anopheles* spp.

Aplicando termoperiodo y fotoestímulo

El método de apareamiento natural se basa en aplicar cambios en la temperatura ambiental con miras a asemejar a lo que sucede en condiciones de campo.¹ En campo la temperatura es normalmente caliente durante el día y a partir del atardecer disminuye gradualmente. Además del termoperiodo se utiliza un fotoestímulo como un detonante del comportamiento sexual de los mosquitos. Esta actividad se inicia poco después de apagar la luz del cuarto de cría, donde se utiliza una lámpara de mano y se proyecta un haz de luz en la jaula con los mosquitos. La luz incide sobre la jaula asemejando los rayos del sol que penetran a través de las hojas de los árboles en el atardecer en condiciones de campo.

Tomando en cuenta estos principios, se desarrolló el método de inducción de cópula natural en *Anopheles* spp.² Con este método se han establecido poblaciones de diferentes especies de *Anopheles* que anteriormente no había sido posible colonizar en forma estable y altamente productivas (cuadro 1).

Consideraciones sobre la colonización de *Anopheles* spp.

Cuando se inicia el establecimiento de una población de *Anopheles* spp. en las primeras generaciones se observará

Cuadro 1

Especies de *Anopheles* adaptadas al insectario con las generaciones y periodo para observar cópulas naturales.

Especie	Lugar de colecta	F ^g	Periodo (meses)
<i>An. pseudopunctipennis</i> ¹	Abasolo, Nuevo León/ 25°56'46.56"N 100°24'33.99'	16	18
<i>An. pseudopunctipennis</i> ¹	Tapachula, Chiapas/ 15°5'49.92"N 92°12'32.83"O	6	7
<i>An. albimanus</i> ⁶	Costa sur de Chiapas/ 14°32'6.50"N 92°13'23.33"O	4	3
<i>An. vestitipennis</i> ⁷	Costa sur de Chiapas/ 14°34'13.50"N 92°12'42.36"O	7	6
<i>An. darlingi</i> ²	Iquitos, Perú/ 03°49'32.40"S 73°21'00.08"	13	12
<i>An. punctipennis</i> [*]	Cuatro Ciénegas, Coahuila/ 26°55'23.58"N 102°06'28.31"O	3	2

poca cantidad de cópulas; sin embargo, conforme avanzan las generaciones, el número de encuentros sexuales aumentarán. Después de varias generaciones, los mosquitos empezarán a copular naturalmente sin necesidad de realizar la inducción de cópula. No existe una regla fija sobre el tiempo en que se observarán las uniones sexuales sin aplicar ningún estímulo, ya que esto depende de varios factores: Las especies de *Anopheles*, las subpoblaciones o fenotipos dentro de las especies y la región geográfica.³

Cuando se observan cópulas naturales es necesario continuar con la inducción de la cópula, porque para este momento se habrá seleccionado una población de mosquitos que copulan en espacios pequeños (dentro de una jaula), bajo condiciones de insectario, pero aún podrían faltar otras dos o tres generaciones adicionales para poderse mantenerse de forma autónoma.⁴ La eficacia de los encuentros sexuales se deberá corroborar con la tasa de inseminación de las hembras, mediante el análisis de espermateca (apéndice VI); ya que en general se considera que la colonia está establecida cuando se observa $\geq 50\%$ de las hembras inseminadas sin inducción de luz. El examen de la espermateca se realiza un día después de finalizar la inducción de cópulas (apéndice VI).

Después de terminados los 5 días de inducción de cópula, se procede a alimentarlas con sangre. Esta actividad estará regulada de acuerdo a protocolos establecidos (apéndice V). Tres días después de alimentadas las hembras se introducen los recipientes de oviposición. Los huevos colectados de dichos recipientes se contabilizan con el apoyo de una lupa.

Cuarto de cópula

Se requiere establecer un cuarto específico para la cópula, el cual debe estar sellado de cualquier luz externa. La duración del fotoperiodo normalmente es de 12:12 (luz:oscuridad) de modo que se asemeja al medio natural; cabe mencionar que pueden variar las horas de luz/oscuridad dependiendo de la localización geográfica y de la época del año; además se debe tomar en cuenta el fotoperiodo exterior. Asimismo, se debe contar con un “Timer” que regule el fotoperiodo diariamente y se debe colocar un higrotermómetro para registrar la temperatura y humedad máxima y mínima diaria.

Es necesario tener registro de la temperatura en el exterior de las instalaciones, con el fin de comparar ambos datos. El área de adultos deberá contar con un regulador de temperatura del aire acondicionado, para poder subir y bajar la temperatura diariamente. En cuanto a la humedad relativa, no es necesario subirla ni bajarla, solo se debe mantener la del ambiente del área de estudio.⁵

Edad recomendada

Para la inducción de cópula natural se utilizan mosquitos machos y hembras de entre 2 a 6 días de edad, ya que es la edad que se consideran maduros sexualmente.

Método de estimulación de apareamiento natural

Se deberán considerar los siguientes aspectos: Estrés, confort, estimulación con luz y cópula.

Estrés

Establecer en el cuarto de cópula una temperatura alrededor de $30\pm 1^\circ\text{C}$, con la finalidad de estresar a los adultos durante el día.

Confort

Disminuir la temperatura progresivamente de $30\pm 1^\circ\text{C}$ hasta $25\pm 1^\circ\text{C}$ en el cuarto de cópula, este proceso debe hacerse cuando inicia la puesta de sol; es decir, durante el crepúsculo vespertino. Con la disminución gradual de la temperatura, se apagan las luces al mismo tiempo que se oculta el sol y se mantiene el cuarto con los mosquitos sin ningún movimiento durante 30 min. El cambio de temperatura permite dar relajamiento o confort a los mosquitos. También durante este tiempo se retiran los algodones con agua azucarada y se vuelven a colocar después de terminado el tiempo de inducción de cópula.

Estimulación con luz

Una vez disminuida la temperatura a $25\pm 1^\circ\text{C}$ en el cuarto de cópula y con la fase oscura del fotoperiodo, se inicia la estimulación de los mosquitos con luz. Se apaga la luz del

cuarto de cría en el mismo momento que se oculta el sol en el exterior y la estimulación con la luz se debe hacer de 15 a 30 min después. Para la estimulación con la luz se proyecta un haz de luz LED (Light-Emitting Diode), con una linterna manual de 1.5 W, a una distancia 30 a 50 cm de la jaula, moviéndola de arriba hacia abajo y de un lado a otro lentamente. Este proceso debe ser repetido durante 5 días consecutivos por 30 a 60 min. Se debe mantener absoluto silencio durante el proceso de inducción y preferentemente la actividad sea realizada por una sola persona, ya que al tener dos o más personas presentes en el cuarto donde se realiza el estímulo sexual, los mosquitos se ven alterados, probablemente por la exhalación de CO₂, el calor corporal y olores que emana dicho personal. También es importante evitar olores fuertes (perfumes, solventes etc.) dentro del cuarto de cópula. Estos pasos en detalle se observan en la figura 13.

Comportamiento de los mosquitos durante la cópula

Para lograr una cópula exitosa dentro las jaulas, se deben considerar los siguientes aspectos:

- Los mosquitos antes del apareamiento se observan muy activos, aún antes del vuelo. Esto sucede poco antes del crepúsculo, donde los machos y las hembras estando en reposo en la pared de la jaula, inician con movimientos en sus patas traseras, frotándolas una con la otra. También se observan movimientos de la cabeza y limpieza de las antenas, principalmente en los machos, aunque también se observa en las hembras. Probablemente lo hacen para mantener erectas sus cerdas antenales y limpieza del polvo, ya que ambos sexos utilizan el sonido emitido por la frecuencia de aleteo para el reconocimiento y selección entre ellos.⁶

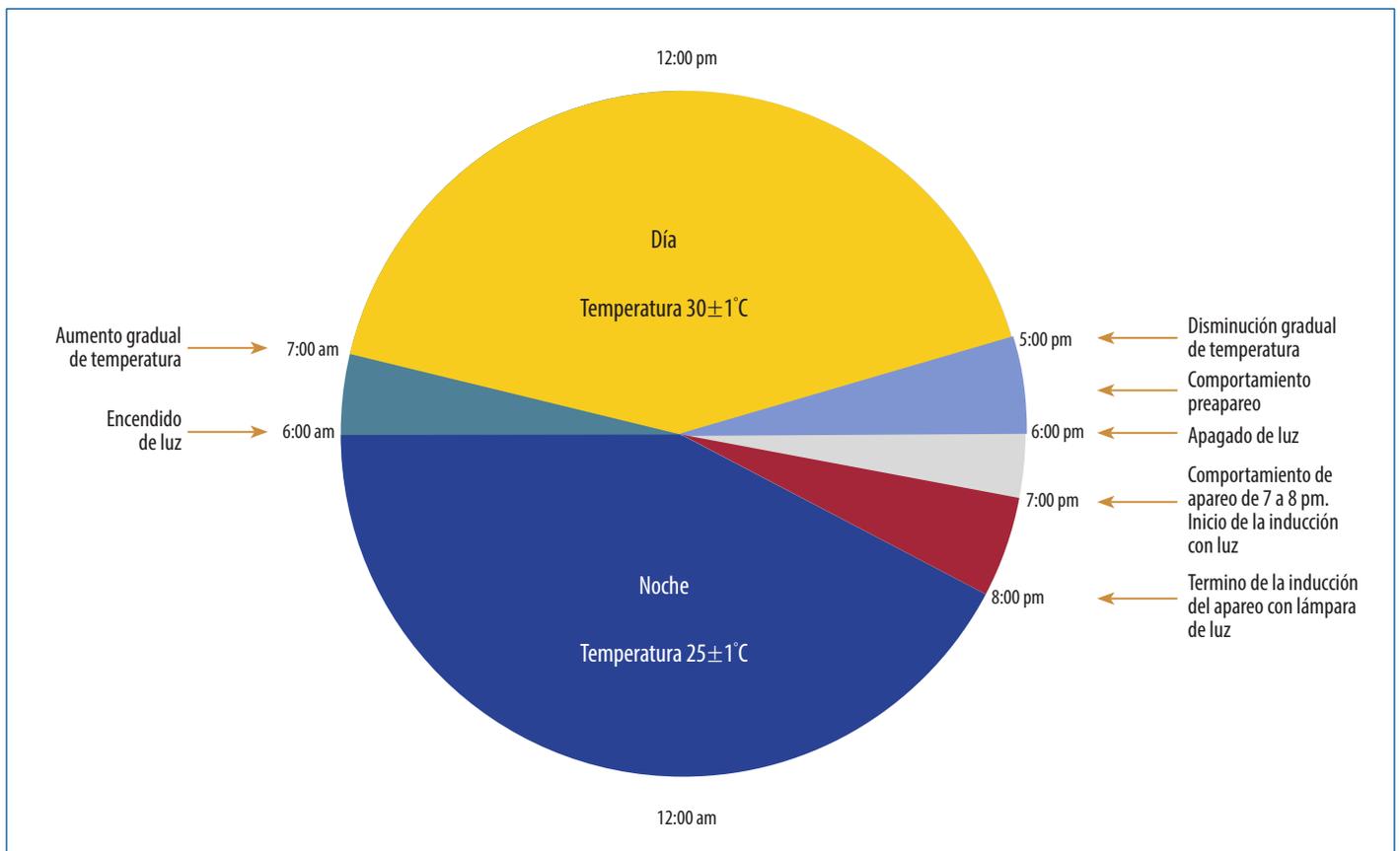


Figura 13 Procedimiento para la inducción del apareamiento en *Anopheles* spp.

- Posteriormente, durante vuelo de apareo se observa que los mosquitos se mueven en zig-zag en busca de hembras que son atraídas al pseudo-enjambre. Esta agitación o excitación en vuelo permite el encuentro y unión de las parejas culminando en la cópula, el cual sucede en promedio a los 20 ± 10 cm sobre el piso de la jaula.

- Durante el acto del apareo se observa que los machos y las hembras caen al piso de la jaula en posición dorso-ventral, estando unidos a través de sus aparatos reproductores por un lapso entre 4-6 segundos, tiempo suficiente para la transferencia de los espermatozoides a la hembra; también se puede observar algunas veces que las parejas unidas caen al piso de la jaula en diferentes posiciones (figura 14).

Registro de cópulas naturales

Con el fin de observar la evolución de la adaptación de la colonia de mosquitos, se registra del número de parejas visibles en cópula dentro de la jaula, durante los cinco días de inducción sexual. Después de terminado este periodo se

tomará una muestra aleatoria de ≈ 30 hembras para el análisis de espermateca y así conocer el porcentaje de hembras inseminadas por generación (apéndice VI). Las uniones se registran por visualización directa. Se puede registrar la actividad sexual de los machos y hembras utilizando una cámara de video. El video se analiza en una computadora, donde se observa el comportamiento sexual y el tiempo de unión de las parejas.

Ventaja del apareamiento natural sobre la cópula forzada

Para establecer una colonia de *Anopheles* sp. se requiere conocer el comportamiento sexual y sus requerimientos. En muchos casos se ha recurrido a la cópula forzada; la cual en términos generales consiste en dormir al macho (incluye cortarle la cabeza) y las hembras con CO_2 o frío y luego bajo el microscopio de disección se unen ambos sexos con el propósito de que el macho enganche a la hembra y le transfiera el respectivo espermatozoide. Este método tiene la gran desventaja que es poco eficiente, consume mucho

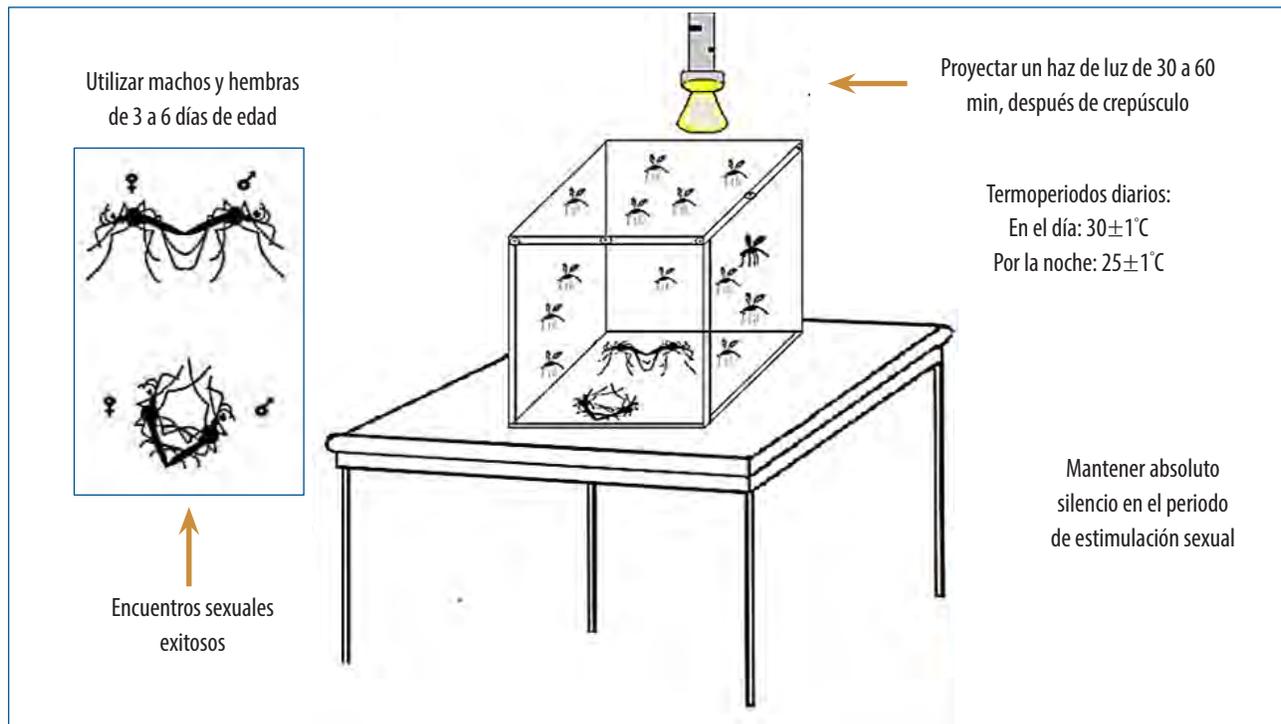


Figura 14 Procedimiento de estimulación del comportamiento sexual de *Anopheles* spp.

tiempo, es tedioso y solo puede ser realizado por personas capacitadas en esta técnica. En base a la experiencia de investigadores que han trabajado con dicha técnica es difícil establecer colonias bajo estas circunstancias. Y, aunque se ha reportado que se logran observar machos y hembras en apareo natural después de varias generaciones, las colonias no son estables ni altamente productivas, esto debido a que no se ha seleccionado naturalmente para las condiciones de insectario. Derivado de estos inconvenientes, se desarrolló el método de inducción con termoperiodo y fotoperiodo, este método ha demostrado ser, mediante la experimentación científica, de alta eficiencia, con poco requerimiento de tiempo dedicado a la estimulación sexual y fácil de aplicar en diferentes poblaciones de *Anopheles* spp. Se ha demostrado que después de aplicar este método por varias generaciones se obtiene una colonia de mosquitos con apareamiento natural, estable y altamente productiva.¹⁻⁴

Recomendaciones finales

El método de inducción de apareamiento natural aquí propuesto puede ser utilizado para el establecimiento de cualquier especie de *Anopheles* en el ámbito mundial, siempre y cuando se apliquen los procedimientos mencionados anteriormente en forma adecuada.

Cabe señalar que el método no es rígido y puede ser adaptado; es decir, se pueden hacer adecuaciones al método de acuerdo con los *Anopheles* spp. que estén siendo sometidas a experimentación; por ejemplo, si un mosquito no responde sexualmente durante el periodo de inducción con la luz, éste puede ser aplicado una hora más tarde, o si las temperaturas de estrés y confort propuestas no funcionan, éstas pueden ser modificadas varios grados centígrados, de acuerdo a las necesidades de cada especie de mosquito y

a su región geográfica. Lo anterior será determinado por el investigador y/o por el encargado de esta actividad, en base a los experimentos de insectario.

Finalmente, esta metodología de inducción sexual de *Anopheles* spp. es una nueva herramienta para explorar en las diversas especies de *Anopheles* en el mundo.

Referencias

1. Villarreal TC, Arredondo JI, Rodríguez MH, A. Ulloa A. Colonization of *Anopheles pseudopunctipennis* from México. *J Am Mosq Control Assoc.* 1998. 14:369-372.
2. Villarreal-Treviño C, Vásquez GM, López-Sifuentes VM, Escobedo-Vargas K, Huayanay-Repetto A, Linton YM, Flores-Mendoza C, Lescano AG, Stell FM. Establishment of a free-mating, long-standing and highly productive laboratory colony of *Anopheles darlingi* from the Peruvian Amazon. *Malar J.* 2015. 30;14:227. doi: 10.1186/s12936-015-0733-0.
3. González-Cerón L, Rodríguez MH, Nettel-Cruz JA, Hernández-Ávila JE, Malo-García IR, Santillán-Valenzuela F, Villarreal-Treviño C. *Plasmodium vivax* CSP-Pvs25 variants from Southern Mexico produce distinct patterns of infectivity for *Anopheles albimanus* versus *An. pseudopunctipennis*, in each case independent of geographical origin. *Parasit Vectors.* 2019;12(1):86.
4. Gerberg EJ, Barnard DR, Ward RA. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. *AMCA Bulletin.* 1994(5):53-56.
5. Gibson G1, Warren B, Russell IJ. Humming in tune: sex and species recognition by mosquitoes on the wing. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2010;11(4):527-40.
6. Villarreal C, Rodríguez MH, Bown DN, Arredondo-Jiménez JI. Low-volume application by mist-blower compared with conventional compression sprayer treatment of houses with residual pyrethroid to control the malaria vector *Anopheles albimanus* in Mexico. *Med Vet Entomol.* 1995 Apr;9(2):187-94.
7. Ramírez López DA. Desarrollo de una técnica de cría masiva de *Anopheles vestitipennis* (Diptera: Culicidae) en condiciones de insectario. Licenciatura. Ciencias Químicas. Tapachula, Chiapas: UNACH, 2006.

zadoras, derivado de la acumulación de llantas de desecho que permanecen a la intemperie donde se acumula agua de lluvia y en los floreros de los panteones o cementerios. También en criaderos naturales como huecos de árboles, plantas bromeliáceas, bambúes y huecos de rocas, entre otros.²⁻⁴

Colecta de adultos

Esta actividad se realiza utilizando herramientas como bomba motomochila, red entomológica, trampas de luz y/o aspirador manual. Cada una de estas herramientas es utilizada en estudios entomológicos, vigilancia, monitoreo de poblaciones, entre otros.^{3,4} Las diferentes técnicas de

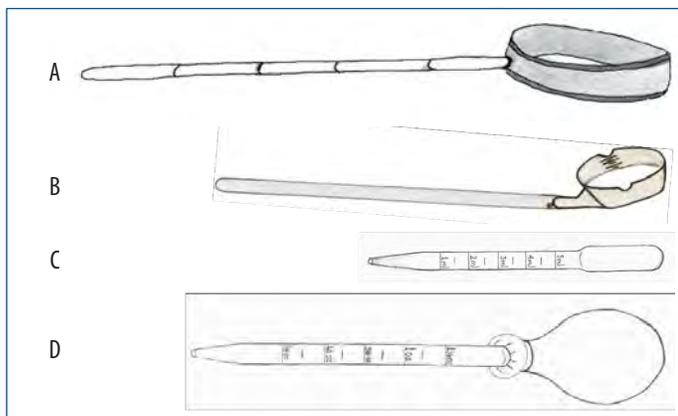


Figura 16 Material de colecta de larvas de aedinos y anofelinos. A y B. Caladores; C. Goteros de 5 ml; D. Pera de succión de 37 ml.



Figura 17 Redes entomológicas para la captura de mosquitos. A. Captura de adultos; B. Captura de larvas.

captura pueden ser aplicadas en intra o peridomicilio para capturar hembras de *Ae. aegypti* y/o *Ae. albopictus* que buscan alimentación sanguínea o que se encuentran en reposo en algún refugio natural o artificial. Para el monitoreo en el interior de las casas, además del equipo de captura, se requiere una lámpara de mano, ya que los mosquitos adultos se esconden o reposan detrás de los muebles como roperos, armarios, estufas, vitrinas, debajo de la cama, atrás del sillón, debajo de la mesa o sillas y en general cualquier espacio entre la pared y los muebles de la casa.

Los especímenes capturados son depositados en contenedores de plástico o cartón, colocando tela tricot en la parte superior y algodón empapado con agua azucarada (10%), para el traslado al insectario. La red entomológica se emplea principalmente para la captura de los mosquitos en vuelo. En el laboratorio, los mosquitos son separados por especie y sexo, tipo de captura, lugar de captura, el punto geográfico, colector, fecha. En el caso de que las hembras de *Aedes aegypti* se requieran para el establecimiento de una colonia en el insectario, de los diferentes métodos de captura se recomienda utilizar el aspirador manual y la red entomológica, con el debido cuidado, cabe subrayar que los mosquitos no deben ser dañados durante la captura, ni en el traslado. Cuando se utiliza el aspirador manual, los mosquitos son introducidos directamente en un bote de cartón encerado o de plástico, recubierto en su interior con papel. En el caso de hembras capturadas con la red entomológica (figura 17), los mosquitos se pueden liberar en jaulas entomológicas de 30x30x30 cm en el lugar de captura.⁴



Figura 18 Condiciones del peridomicilio mostrando diferentes hábitats larvarios de *Aedes aegypti* y los hospederos animales que se alimenta.

Colecta en exteriores

Para la captura de *Aedes* sp. se hace una búsqueda intensa en cualquier recipiente con agua estancada. Por ejemplo: piscinas, floreros, tambos, huecos de rocas, huecos de árboles, latas, llantas. Dentro de las áreas donde normalmente hay criaderos positivos es en panteones y llanteras (vulcanizadoras). Ejemplos de captura en las figuras 19 y 20.

Todas las larvas y pupas capturadas serán trasladadas al insectario. Se recomienda utilizar la misma agua del criadero para el traslado, siempre con la precaución de evitar que el agua contenga depredadores. Se debe hacer una descripción de hábitats larvario.

Recomendaciones técnicas para capturar mosquitos en las viviendas

- El primer paso al llegar a una localidad se deberá contactar con las autoridades correspondientes, explicando el motivo de la visita y objetivos del proyecto.
- Los técnicos de campo se presentan en las casas por parejas. Se recomienda acudir en horarios matutinos de 8:00 a 15:00 h. Siempre portando el gafete de identificación vigente.
- Se pide el permiso o anuencia correspondiente al padre o jefe de familia. Si no se encuentra el(la) jefe(a) de familia y sólo se encuentran menores de edad, no se deberá ingresar a la vivienda.



Figura 19 Colecta de larvas de *Aedes* sp. en condiciones de campo. 1. piscina, 2. florero en un sepulcro, 3. pileta en panteón.

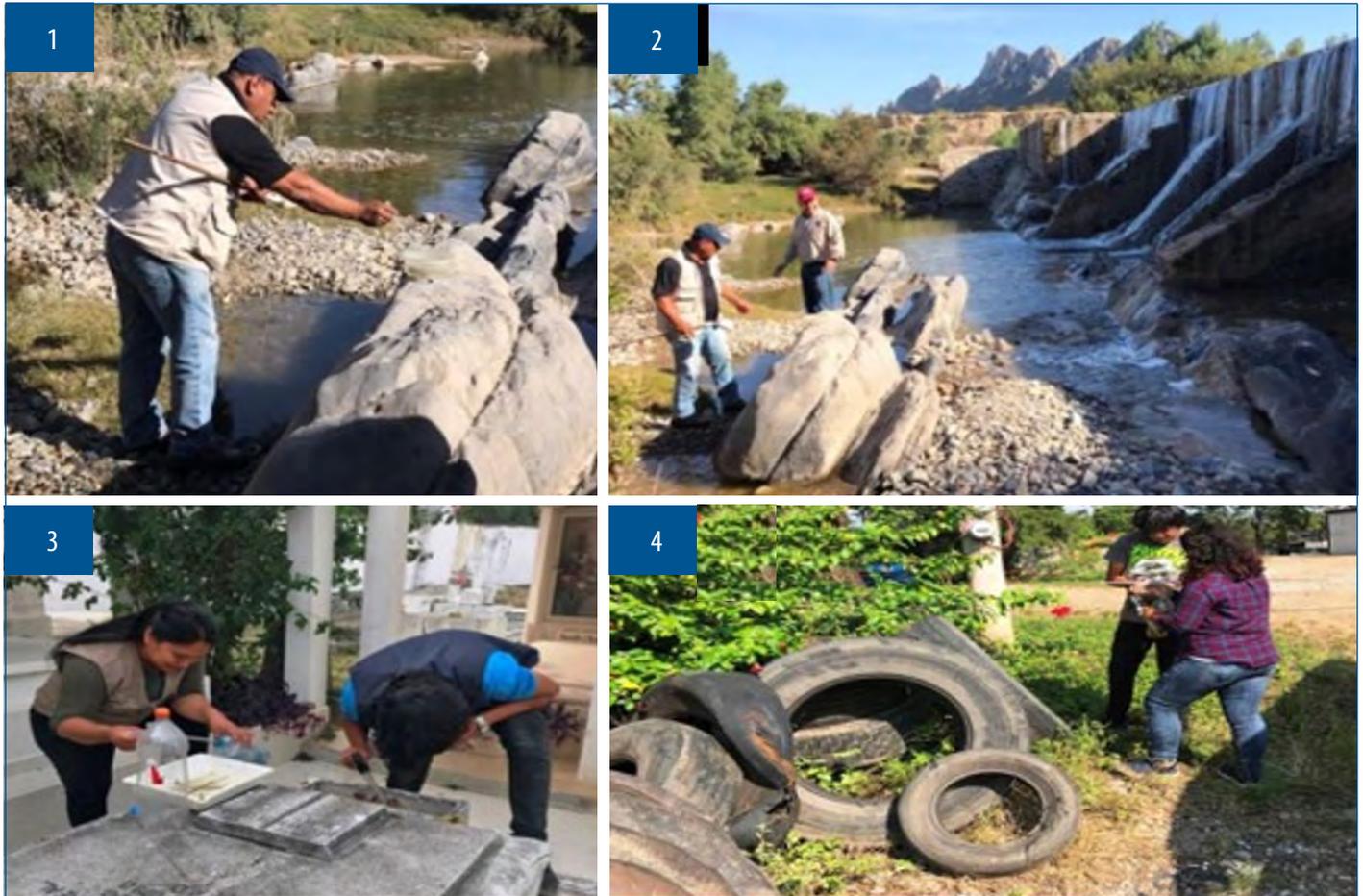


Figura 20 Colecta de larvas de *Anopheles* sp. en márgenes de río (1 y 2) y *Aedes* sp. en condiciones de campo. Florero en un sepulcro (3) y llantera o vulcanizadora (4).

- Una vez obtenido el permiso, entre dos trabajadores se introducen en el interior de las viviendas, se procede a la búsqueda de los mosquitos, iniciando con la pared izquierda y siguiendo en dirección de las manecillas del reloj, se rastrea cuarto por cuarto, revisando cada rincón oscuro y posible lugar de reposo de los mosquitos.
- Los mosquitos capturados se introducen en los recipientes de cartón encerado y después de colocar algodón húmedo con agua azucarada al 10%, se procede a llenar un formato de captura por casa muestreada.
- Los datos básicos que tendrá el formato son: Dirección de la casa, método de captura, sitio y superficie de captura, hora de captura, fecha, posición geográfica, número de mosquitos, especies de mosquitos, nombre de los colectores.
- Posteriormente se procede a realizar la captura de mosquitos en refugios naturales y artificiales en el patio de la casa. También se podrá realizar en este momento la colecta de huevos, larvas o pupas.
- Los estadios inmaduros de colectarán y se introducirán en recipientes de plástico como botellas o en bolsas de plástico (Whirl-pak).

Anofelinos

Colecta de larvas y pupas

Las herramientas básicas requeridas para las colectas larvianas son caladores, pipetas o goteros de plástico de 5 ml (figura 16), bolsas de plástico tipo Whirl Pak, etiquetas adheribles, masking tape, marcadores de tinta indeleble, botas, charolas blancas, termos o hieleras y formatos de registro.

El primer paso para realizar estudios de recolección de larvas es elaborar un croquis o mapa de la localidad en el cual se describan la localización y distribución de los criaderos por tipos. Estos mapas pueden incluir características geográficas (georreferenciación), epidemiológicas y demográficas del lugar con la finalidad de apoyar los programas de control de mosquitos. Existen varias técnicas para la colecta de larvas de mosquitos; sin embargo, en la práctica, las más usadas son caladores, redes, y succionadores (figuras 16 y 17).

Colecta de adultos

Las hembras de campo pueden ser capturadas bajo diferentes métodos,³⁻⁵ los más relevantes son: trampas de luz, colecta de mosquitos en reposo intra y peridomiciliario, colecta en refugios naturales, colecta en corrales, trampa cortina con cebo animal y cebo humano protegido,¹ este último método reemplaza al cebo humano sin protecciones, método de carácter tradicional y más antiguo que ya no es recomendable utilizar.

Las hembras colectadas se trasladan al Insectario en contenedores de plástico colocando algodón impregnado con agua azucarada al 5%. Para asegurar la sobrevivencia de las hembras durante el traslado se recomienda que el contenedor con las hembras de campo no se exponga al sol y evitar cambios bruscos de temperatura, para ello el

vehículo de traslado debe contar con un sistema de aire acondicionado. En algunas ocasiones las hembras de campo son colectadas después de la ingesta de sangre, sobre todo si son capturadas cerca de corrales de ganado, en este caso no será necesario proporcionarles alguna alimentación sanguínea, solamente se colocan los recipientes de oviposición adecuados, asimismo, si las hembras de campo se encuentran sin alimentación sanguínea, será necesario proporcionarles al menos dos alimentaciones, ya sea con un animal vivo o mediante alimentadores artificiales (apéndice V). Los huevos obtenidos de las hembras de campo se consideraron como la F_0 .

Para mayor información sobre las técnicas de colecta de larvas, pupas y adultos de anofelinos, se recomienda consultar el Manual para la vigilancia y el control del paludismo en Mesoamérica.⁵

Referencias

1. Casas Martínez M, Orozco Bonilla A, Muñoz Reyes M, Ulloa García A, Bond JG, Valle Mora J, Weber M, Rojas JC. A new tent trap for monitoring the daily activity of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *J Vector Ecol.* 2013 Dec;38(2):277-88. doi: 10.1111/j.1948-7134.2013.12041.x.
2. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. TDR (for Research on Diseases of Poverty). Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. La Paz, Bolivia: OPS/OMS, 2009. Disponible en: https://www.who.int/denguecontrol/resources/dengue_guidelines_2009/es/
3. Service MW. Mosquito Ecology. Field sampling methods, 2a Ed. Elsevier Applied Science, 1993.
4. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Guía de colecta entomológica. México: INDRE, 2009. Disponible en: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/guia_colecta_entomologica_InDRE.pdf
5. Rodríguez MH, Ulloa-García A, Ramsey JW, Eds. Manual para la vigilancia y control del paludismo en Mesoamérica. 1ed. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2008.

Apéndice II. Guía rápida para el montaje de un insectario

Medidas básicas de seguridad

- Colocar puertas con malla mosquitera, tapar los hoyos o fisuras de la pared.
- La tarja debe contar con un sistema de malla fina y nunca se deben depositar larvas o huevos por este acceso, ya que pueden sobrevivir y salir al ambiente.
- Las tiras de papel filtro con huevos de desecho deben ser sometidas a un proceso de eliminación con calor de 110°C por 15 min (autoclave) antes de descartarlas a la basura.
- En ciertas regiones tropicales las hormigas son un problema serio, ya que se comen los huevos, las larvas, pupas y/o adultos; para evitar esto se pueden colocar cha-

rolas de plástico con aceite de automóvil en la base de los estantes, de preferencia aceite nuevo para evitar vapores perjudiciales.

Condiciones ambientales del insectario

- Respetar el fotoperiodo de 12:12 Luz:Obscuridad, de preferencia optar por sistemas automatizados (figura 22).
- La temperatura del insectario puede ser mantenida de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A esta temperatura pueden mantenerse las larvas y adultos en el mismo cuarto. Todo dependerá de la especie que se va a criar.



Figura 21 Medidas de seguridad en el área de insectario.

- Contar con un sistema de agua limpia, que no tenga contacto con algunos productos químicos como cloro o larvicidas, utilizando un filtro convencional.

Para mayor información se recomienda consultar las Guías de contención de artrópodos¹ y el Manual de bioseguridad referente a laboratorio, bioterio e insectario de la Organización Mundial de la Salud.²

Referencias

1. Benedict MQ, Tabachnick WJ, Higgs S, Azad AF, Beard CB, Beier JC, Handler AM, James AA, Lord CC, Nasci RS. Arthropod containment guidelines (Version 3.1): A project of the American Committee of Medical Entomology of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2003;3(2):63.
2. World Health Organization, Laboratory Biosafety Manual, 3rd Edition. WHO, 2004. Disponible en: <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>



Figura 22 Sistema de iluminación en insectario.

Apéndice III. Buenas prácticas de laboratorio aplicadas al insectario

Primeramente, el insectario debe contar con un responsable, quien debe conocer y contar con los Manuales de Procedimiento del área y, a su vez, puede contar con subalternos responsables de cada área, ya sea por especie o por áreas del procedimiento (cuartos de cría, alimentación, cópula, etc.).

Todos deben conocer los procedimientos técnicos, de bioseguridad y las buenas prácticas a seguir, las rutas de evacuación, así como el equipo de protección inherente al área. Se deberá seguir la normatividad de cada país y de las Instituciones a las que pertenezca el Insectario, para reglamentación internacional se pueden consultar los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud¹ y el sitio WEB del Grupo de Trabajo de Buenas Prácticas de Laboratorio de la OMS.²

A continuación se mencionan las reglas básicas:

1. Llevar bitácoras de registro

- Los técnicos de insectario deberán llenar una bitácora con sus actividades diarias. Debe ser por técnico y/o por área asignada.
- También se debe tener una bitácora de la producción diaria de pupas, por especie, de todo el insectario.
- El registro deberá contener fecha y hora, nombre completo y firma de quien lo realice; dicho registro deberá ser supervisado periódicamente por el coordinador o jefe inmediato de área.
- Todas las bitácoras deben estar foliadas. Ninguna hoja de las bitácoras y/o registros puede ser retirada y cualquier cambio de datos (de preferencia no debe ocurrir) tendrá que ser firmado por quien lo realizó y deberá colocarse la fecha del suceso.
- Los equipos del área deberán ser analizados para comprobar su buen funcionamiento diario, semanal o mensual según sea el caso. Los equipos incluyentes son:

Higrotermómetro, aire acondicionado, filtros de agua, timer, balanzas analíticas, autoclave, entre otros.

2. Medidas de seguridad

- Está prohibida la entrada a personas ajenas a las actividades de insectario.
- Se pueden recibir visitas de trabajo previa notificación, pero éstas deben apegarse a los protocolos establecidos y deberán registrar su ingreso, se les debe suministrar una bata y un gafete de visita como elementos mínimos de ingreso. Para la toma de fotografías y videos se requiere el permiso por escrito del responsable del área.
- Deberá permanecer el manual de procedimientos en cada área y todo el personal debe de saber su ubicación.
- Por norma de seguridad no se deben introducir alimentos para evitar la atracción de hormigas y cucarachas, las cuales son muy perjudiciales para los mosquitos.
- Está prohibido el uso de insecticidas, repelentes, solventes o perfumes que provoquen la muerte o afecten físicamente el comportamiento de los mosquitos.
- El personal que labora dentro del área del insectario debe tener la instrucción de no tocar ningún solvente o sustancias insecticidas que dañen el material biológico, si esto sucede deberá informarlo al responsable del área, quien valorará la situación y de ser necesario suspenderá su estancia en el área.
- El material biológico por ningún motivo debe ser sacado del área sin previa autorización. Asimismo, no se debe introducir material biológico que no esté autorizado por el jefe inmediato. Dicho material antes de introducirlo al insectario, deberá pasar por un proceso de cuarentena, donde se analizará interna y externamente en busca de agentes infecciosos que pudieran poner en riesgo las colonias de mosquitos.

- Una vez determinada la sanidad del material biológico, se recomienda introducir la F_1 de estos insectos.
- El material biológico debe ser verificado por un taxónomo para determinar la(s) especie(s).
- Todo el personal asignado al área de insectario deberá utilizar la vestimenta adecuada: bata, guantes y cuando se requiera de goggles.

3. Materiales

- Todo material debe ser lavado apropiadamente, preferentemente utilizando jabón biológico, para evitar residuos que pudieran afectar la cría masiva de los insectos.
- No deben utilizarse jabones con demasiado olor o solventes volátiles que pudiera interferir en el comportamiento normal de los insectos.
- Todo el material es de uso exclusivo de insectario.
- El material de uso (charolas, jaulas, goteros, recipientes para pupas) deben ser exclusivos de cada especie o cepa y todo debe ser etiquetado, asimismo las tiras de oviposición deberán contener los datos de especie, fecha y quien lo realizó.
- El material en uso para la reproducción, es decir, charolas y jaulas, deberán ser etiquetado con la especie y fecha.

4. Cuarentena

- Todo material biológico colectados en campo, debe pasar por un proceso de cuarentena en un área dispuesta para ello en el insectario, durante este proceso de separación de las demás colonias, deberán realizarse estudios de laboratorio para determinar si la cepa se encuentra libre de microorganismos que pudieran dispersarse entre las poblaciones.

Referencias

1. World Health Organization, Laboratory Biosafety Manual, 3rd Edition. WHO, 2004. Disponible en: <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
2. Organización Panamericana de la Salud. Grupo de Trabajo de Buenas Prácticas de Laboratorio [internet]. Washington DC: OPS. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=1049:2008-grupo-trabajo-buenas-practicas-laboratorio&Itemid=41776&lang=es

Apéndice IV. Procedimientos estandarizados para el sexado de pupas

1. Primero se requiere calibrar el equipo,^{1,2} con el fin de asegurar que se encuentran en forma paralela los dos vidrios que lo componen (figura 23).

2. Se agrega agua en la parte superior sin ninguna pupa para calibrarlo. Cuando se encuentran ambos vidrios paralelos, el agua cae en la parte inferior en forma de un árbol, es decir el chorro de agua se dispersa en la parte central del aparato y se distribuye hacia abajo, hasta llegar a los bordes de los dos extremos, pero sin que salga por los lados.

3. Después de la calibración, se vierten las pupas en la parte superior. Agregar agua con una manguera o un recipiente, de tal forma que las pupas bajan a la parte media del aparato separador y conforme se agregan más pupas, se forman dos líneas paralelas en forma horizontal.

4. Las pupas machos, por ser de menor tamaño, permanecen en la línea inferior y las hembras en la línea superior. Normalmente también se presenta un traslape entre hembras pequeñas y machos grandes; siendo un porcentaje de traslape del 5%, el máximo permitido para determinar una calibración óptima (figura 24). El grupo de traslape puede ser extraído manualmente.

5. La cantidad máxima para separar por evento son ≈ 1200 pupas. Si se coloca mayor cantidad de pupas, se incrementa el error de sexado. Al saturar el sistema las pupas tienden a salir por los lados del aparato.



Figura 24 Pupas: hembras (A) y machos (B) de *Aedes aegypti* formando dos líneas de separación.



Figura 23 Aparato para el sexado de pupas de John W. Hock Company®.

Se recomienda el uso de este aparato separador de pupas ya que en pruebas realizadas en el insectario del CRISP, ha demostrado una efectividad del 97% para pupas macho y 98% para pupas hembra y ha disminuido considerablemente el tiempo de separación en un 87%, siendo sólo 7 minutos el tiempo requerido para sexar 1 180 pupas comparado con el método tradicional manual con pipeta que requiere un tiempo promedio de 57 minutos (cuadro 2).

Referencias

1. John W. Hock Company. Separador de larvas y pupas Modelo 5412 [internet]. Disponible en: <https://johnwhock.com/products/laboratory-equipment/larval-pupal-separator/>
2. Focks DA. An improved separator for the developmental stages, sexes, and species of mosquitoes (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 1980;17(6):567-8.

Cuadro 2

Efectividad entre el sexado de pupas de manera manual en comparación con el aparato separador.

Tratamiento	Trabajador	# pupas sexadas	Tiempo de sexado (min)	Efectividad	
				Machos (%)	Hembras (%)
Manual	1	1000	66	59	76
Manual	2	1109	43	97	98
Manual	3	1094	53	97	96
Manual	4	1231	65	96	95
Aparato separador	5	1180	7	97	98

Datos no publicados. Cuauhtémoc Villarreal Treviño 2018.

Apéndice V. Procedimientos estandarizados para la alimentación sanguínea de mosquitos

Las hembras de mosquitos del género *Anopheles* sp. y *Aedes* sp. requieren de al menos una alimentación sanguínea para iniciar la ovogénesis. Normalmente en la cría de insectario las hembras y los machos son mantenidos desde su emergencia de la fase de pupa en jaulas de aluminio forradas con malla mosquitera, en un ambiente controlado. Los insectos permanecen de 3 a 7 días en estas condiciones antes de ofrecerles una alimentación sanguínea. Este periodo de tiempo se emplea principalmente en el apareo de los machos y las hembras, para así asegurar una alta tasa de inseminación, lo que impactará en mayor cantidad de huevos viables.

Las jaulas donde permanecen los mosquitos pueden variar en tamaño y forma, en general se utilizan en forma cúbica desde 30 cm hasta 60 cm, de cada lado. Estas jaulas normalmente son revestidas en cinco de sus lados con una malla de luz de calibre 1.5 x 1.5 mm y, al frente, una manta blanca que permite el acceso a la jaula de manera controlada para la manipulación de los mosquitos.

Se puede usar sangre de diferentes tipos, de ovejas o vacas, que son utilizadas para consumo de carne de forma comercial. Es indispensable que la sangre cuente con un certificado de que se encuentra libre de microorganismos y que está sujeta a la normatividad de cada país.

Una vez obtenida la sangre, se le da un tratamiento agregando 5 ml de Heparina sódica (100 mg/ml) para un tubo de 50 ml, como anticoagulante para la colección de 50 ml de sangre.

1. Proceso de obtención: antes de sacrificar al animal, se pincha la vena yugular y se colectan 50 mm de sangre en el tubo con heparina, se mezcla por agitación lenta para homogenizar y se tapa para su transporte y almacenamiento.

2. Transporte y Almacenamiento: los recipientes con la sangre se colocan en termos de unicel manteniéndose aproximadamente a 4°C para su transporte al laboratorio.

3. Almacenamiento: la sangre que no sea utilizados inmediatamente se almacenan a -20°C.

4. Preparación de la sangre para alimentar los mosquitos: el tubo con 50 ml de sangre heparinizada, se coloca en un baño María a 37°C y se toman 3 ml para la alimentación.

5. *Baño María* circulante: se prepara el *Baño María* con agua circulante a 37°C, conectado mediante mangueras de látex a unas campanas de vidrio para alimentación que permite la circulación de agua (figura 25), con una superficie de contacto en la parte inferior cóncava, la cual es sellada por una membrana para que contenga la sangre de la que se alimentarán los mosquitos, a través de la malla del techo de la jaula que los contiene (figura 26).

5. Alimentación con sangre: preparado el sistema de calentamiento se agregan tres ml de sangre en el interior de la campana hasta observar que se dispersa en la superficie de la membrana artificial al fondo de la campana y que deberá estar en contacto con la malla del techo de la jaula. Las mangueras de látex que queden sobre el techo de la jaula deberán ser bloqueadas por un aislante térmico que no permita transferir el calor a la malla de la jaula y distraer a los mosquitos (figura 25).

6. Tiempo: Se dejan los alimentadores sobre la jaula aproximadamente 1:30 h, dependiendo de la cantidad de mosquitos que se observen en el proceso de alimentación. Cada 10 o 15 min, las campanas deberán ser agitadas suavemente para mantener la homogeneidad entre la fase acuosa y globular de la sangre.

7. Término del tiempo de alimentación: una vez transcurrida la alimentación, se apaga el *Baño María* circulante y

se retiran las mangueras de las campanas de alimentación, de tal forma que no se rompan las membranas, ni tampoco se riegue el remanente de agua que circulaba por las mangueras. Las campanas se dejan remojar en agua con cloro diluida (20%) para desechar el remanente y posteriormente las campanas se lavan y esterilizan para su uso posterior.

Antes de iniciar cualquier procedimiento de alimentación con sangre, asegúrese de cumplir con las buenas prácticas de laboratorio, cumplir con las normas de Bioseguridad de su Institución y con la normatividad de desecho de residuos biológicos del país donde se encuentre.



Figura 25 Baño circulante para la alimentación.



Figura 26 Hembras alimentándose de sangre.

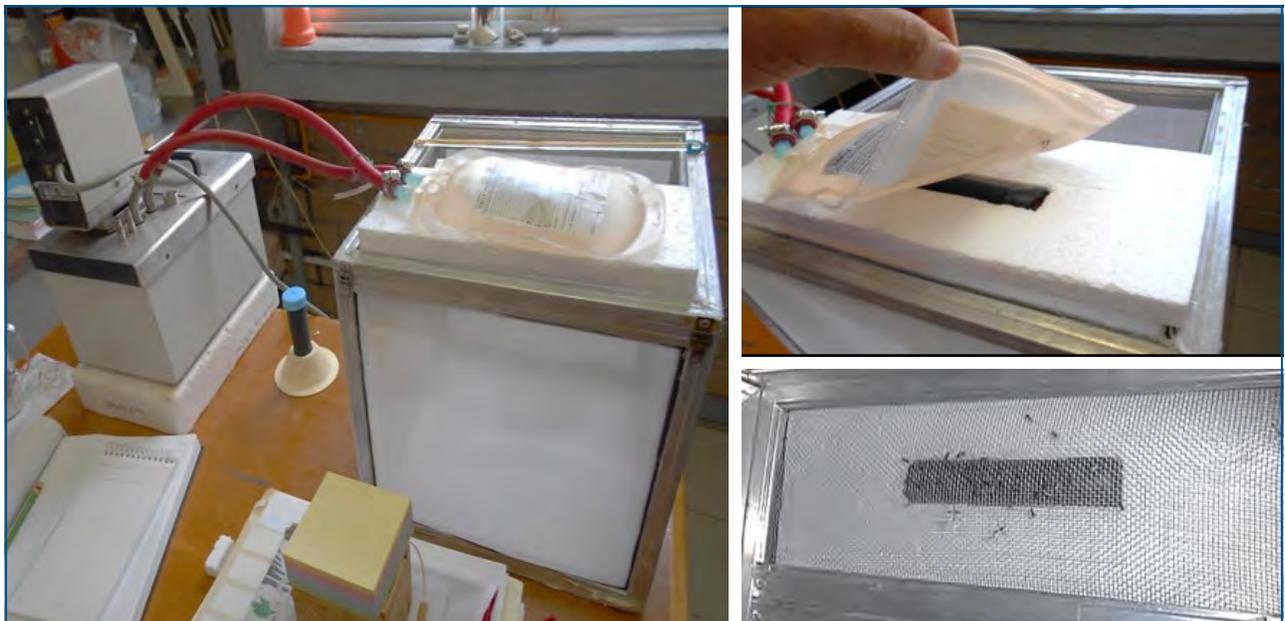


Figura 27 Alimentación sanguínea de mosquitos utilizando membrana de colágeno.

Apéndice VI. Control de calidad de los mosquitos del insectario

Con el creciente interés de liberación en masa de mosquitos infectados con *Wolbachia* y/o liberación de mosquitos irradiados con el fin de controlar el dengue, más las tradicionales pruebas de eficacia y/o resistencia de insecticidas, es una prioridad mantener la calidad en los mosquitos producidos. Asimismo, en un insectario donde se produce alta cantidad de material biológico, se requiere conservar el componente calidad, para lo cual se han seleccionado tres parámetros o indicadores: a) tamaño corporal de 100 hembras o machos medido por el tamaño del ala derecha o izquierda; b) peso de 100 hembras o machos y el análisis de órganos internos, y c) análisis de estómagos y ovarios en busca de parásitos tal como las microsporidias. Esto se debe realizar por cada generación y se debe registrar por especie o fenotipo, como referencia para comparar los resultados obtenidos en los diferentes proyectos de investigación u operativos. Estas medidas de calidad se han aplicado en varios experimentos de campo donde se comprobó que los mosquitos de insectario se criaron de mayor tamaño que los de campo, con menor variación y alta sobrevivencia, de tal manera que logran competir con los mosquitos de campo (Yeap 2013). Cada uno se detalla a continuación.

1. Procedimiento estandarizado para la medición de alas de los mosquitos

1. En una impresora láser se imprime un formato diseñado en Microsoft Word®, para la medición y almacenamiento de alas de mosquitos, con una serie de 10 x 10 cuadros de 1.5 x 0.5 cm cada uno, para un registro de 100 alas. Cada celda contiene una barra de 2 milímetros de largo que será utilizada para la medición del ala (figura 28).

2. Bajo el microscopio estereoscópico se corta el ala derecha o izquierda de un mosquito y se coloca sobre el

cuadro correspondiente en el formato para su medición (figura 29). Se deberá registrar si es macho o hembra y las características generales en el formato de registro.

3. El ala se coloca con la parte dorsal hacia arriba y se fija con un adhesivo transparente en el cuadro del formato.

4. Una vez cortadas 100 alas se fotografían con el uso de un microscopio estereoscópico.

5. La barra impresa de 2.0 mm en los cuadros del formato en donde son colocadas las alas, se calibra mediante una línea de medición en centímetros.

6. La medición del ala se realiza desde la muesca del álula del ala del mosquito hasta el ápice de la misma, sin tomar en cuenta las fimbrias, posteriormente se extrapola y se obtiene la distancia real en milímetros mediante una regla de tres, obteniendo así el tamaño del ala.

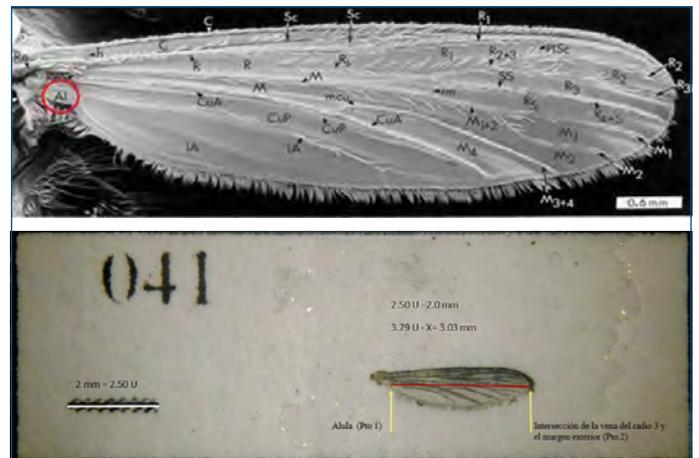


Figura 29 Medición de ala como control de calidad. Venación típica de *Aedins*, mostrando el Álula (AL): del latín *alula*, es el diminutivo de ala.

Registro No.: _____

Genero _____ Especie _____ ♀ _____ ♂ _____ Ceba _____

Posición: Dorsal*. Ala: Der. ____ Ala: Izq. ____

Objetivo Estereoscopio / Microscopio _____ Marca y Modelo _____

Cámara / Scanner: Marca y Modelo _____ Parámetros _____

001	002	003	004	005	006	007	008	009	010
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
011	012	013	014	015	016	017	018	019	020
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
021	022	023	024	025	026	027	028	029	030
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
031	032	033	034	035	036	037	038	039	040
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
041	042	043	044	045	046	047	048	049	050
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
051	052	053	054	055	056	057	058	059	060
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
061	062	063	064	065	066	067	068	069	070
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
071	072	073	074	075	076	077	078	079	080
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
081	082	083	084	085	086	087	088	089	090
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
091	092	093	094	095	096	097	098	099	100
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Observaciones: _____

Figura 28 Formato de registro para medición de alas.

2. Procedimiento estandarizado para determinar el peso de mosquitos (mg).

1. Se toma una muestra aleatoria de las jaulas del insectario de mil machos y mil hembras.
2. Los insectos colectados deberán estar vivos de 1 o 2 días de edad.
3. Sexar desde pupa o en estado adulto. No mezclar machos con hembras.
4. En el caso de las hembras deben permanecer sin previa alimentación sanguínea. Ambos sexos alimentados solo con agua azucarada (5%).
5. Los mosquitos se duermen con baja temperatura (-4°C o menos) o utilizando cloroformo.
6. Se colocan en una cámara de desecación por dos días.
7. Se pesan en grupos de 100 mosquitos (figura 30).
8. Se obtiene el peso promedio de mil machos y mil hembras por generación en miligramos (mg).
9. Durante el proceso de pesado tener cuidado de no romper alas o patas.

3. Procedimientos estandarizados para la disección de espermatecas de *Culicidos*

1. Se derriban las hembras de mosquitos para el análisis de espermateca mediante choque térmico a -3°C , por 15 minutos y se colocan posteriormente en una placa Petri de cristal refrigerada.
2. Se elige un mosquito y se coloca sobre una gota esparcida sobre un cubre objeto formando una película de solución salina.
3. Bajo un microscopio estereoscopio se extrae el último segmento torácico y ahí, en la parte interna se observan tres espermatecas, que tienen forma cilíndrica color marrón.
4. Se aíslan las espermatecas y se colocan en una gota de solución salina, a la que luego se le coloca un cubre objeto.
5. Posteriormente, se observa la muestra en un microscopio compuesto, se ubican las espermatecas con el objetivo de 4X y posteriormente se observan con objetivo de 40X (figura 31).



Figura 30 Pesado de mosquitos de *Aedes aegypti* para el control de calidad.

6. En el caso de observar las espermatecas de color café con apariencia hialina sin presencia de espermatozoides, se considera negativa (-) (figura 31).

7. En el caso de los *Aedinos*, se identifican tres esferas, las cuales por su aspecto transparente evidencian la presencia de espermatozoides, será indicativo de un diagnóstico de espermateca positiva (+) (figura 31).

8. Los *Anophelinos* solo poseen una espermateca.

Nota final:

- Se deberán conservar las buenas prácticas de laboratorio referentes a registros, bitácoras y manejo de mosquitos (apéndice III).

Referencias

1. Yeap HL, Endersby NM, Johnson PH, Ritchie SA, Hoffmann AA. Body size and wing shape measurements as quality indicators of *Aedes aegypti* mosquitoes destined for field release. *Am J Trop Med Hyg* 2013; 89(1):78-92.



Figura 31 Espermatecas de *Aedes epactius*. 1. Espermatecas con objetivo 4x, 2. Espermatecas negativas (-), 3. Espermatecas positivas (+).

Glosario

Abdomen. Última de las partes en las que se divide el cuerpo de los insectos. No tiene patas ni alas, en él se encuentran la mayoría de los órganos internos del animal. Tiene como máximo 12 segmentos.

Aedeagus. Órgano copulador intromitente de los insectos machos.

Alas. Apéndices torácicos de la mayoría de insectos. Generalmente dos pares ubicados en el mesotórax y metatórax. En el Orden Díptera poseen un par de alas, el segundo par es el halter.

Alado. Que posee alas.

Ciclo gonotrófico. Se refiere al periodo donde la hembra obtiene la ingesta de sangre hasta la ovoposición, se cierra el ciclo con la siguiente alimentación sanguínea.

Cutícula. Capa no celular que recubre al insecto. En los artrópodos las células epidérmicas segregan una sustancia (principalmente quitina) que forma una estructura dura y resistente.

Ecdisis (muda). Cambio periódico de la cutícula.

Entomología. Ciencia que estudia diferentes aspectos de los insectos: su forma, ubicación y funcionamiento de órganos internos, desarrollo y metamorfosis, relación con el ambiente y ubicación en grupos taxonómicos.

Entomopatógeno. Organismo causante de enfermedades en los insectos, normalmente, bacterias, virus, protozoos u hongos.

Esclerito. Nombre que se utiliza para designar las piezas duras diferenciadas en el cuerpo de los insectos.

Especie. “Las especies son grupos de poblaciones naturales con cruzamiento entre sí que están aisladas reproductivamente de otros grupos” (Mayr, 1991).

Espermateca. Depósito presente en el aparato reproductor femenino, donde son almacenados temporalmente los espermatozoides.

Espermatóforo. Pequeña cápsula conteniendo espermatozoides que producen algunos machos.

Espiráculo. Zona donde las tráqueas se invaginan, normalmente en la zona pleural. Abertura externa de las tráqueas.

Estadio. Periodo entre mudas durante el desarrollo de los artrópodos.

Estado. Etapa bien definida en el desarrollo de un insecto. Por ejemplo: huevo, larva, ninfa, pupa, adulto.

Estilete. Apéndice estrecho, alargado, puntiagudo o afilado, usado para perforar tejidos.

Exoesqueleto. Recubrimiento, por lo general duro, que envuelve el cuerpo de los artrópodos y que proporciona sostén al cuerpo actuando como un esqueleto. El exoesqueleto está formado por la cutícula.

Exuvia. Restos de la cutícula, después que el insecto muda.

Género. Categoría de clasificación ubicada entre la familia y la especie.

Gonoporo. Poro genital.

Hábitat. Área natural que ocupa una población, delimitada por ciertos factores ecológicos.

Halteres (balancines). Estructuras alargadas, generalmente más grandes en su extremo terminal. Son característicos de la orden díptera y son una modificación de las alas posteriores. Ayudan al insecto a guardar equilibrio durante el vuelo.

Hematófago. Insectos que se alimenta de sangre.

Hexápodo. Artrópodo con 3 pares de patas, insecto.

Holometábolo. Insectos cuyo desarrollo comprende las fases de: Huevo, larva, pupa y adulto o imago. Presentan metamorfosis completa.

Imago. Nombre dado al insecto adulto.

Insecto. Clase de los artrópodos. Son artrópodos de respiración traqueal, cuerpo dividido en segmentos agrupados

en forma que constituyen tres partes fáciles de apreciar: cabeza, tórax y abdomen; tienen además, seis patas, dos o cuatro alas por lo común y exoesqueleto. Constituyen el grupo más numeroso de los artrópodos ya que representan el 70% de sus especies.

Larva. Forma en que salen del huevo los insectos holometábolos. Son capaces de alimentarse pero normalmente de forma diferente a la del adulto. Por ejemplo, las orugas de las mariposas, larvas de mosquito.

Metamorfosis. Cambios de forma que sufren los insectos después de emerger del huevo, hasta convertirse en adultos.

Muda. Cambio periódico del exoesqueleto en los artrópodos para poder crecer.

Néctar. Secreción azucarada de muchas plantas, producida por las flores u otras estructuras, frecuentemente perfumada. Es el alimento principal de muchos insectos, especialmente Apoidea (Hymenoptera), Lepidoptera y algunos Diptera.

Ovario. Órgano productor de óvulos en la hembra.

Ovariolo. Cada uno de los tubos que en conjunto forman el ovario.

Oviducto. Par de tubos por donde pasan los óvulos y que al unirse forman la vagina.

Ovípara. Variante de la reproducción sexual donde la hembra coloca los huevos en el exterior y después de tiempo variable eclosionan.

Población. Conjunto de individuos de la misma especie que comparten un mismo hábitat.

Patas. Cada uno de los segmentos torácicos presenta un par de patas que se dividen, del extremo proximal al distal, en: coxa, trocánter, fémur, tibia, tarso, pretarso.

Pupa. Estado entre la larva y la forma adulta de los insectos holometábolos durante el cual dejan de comer y sufren cambios morfológicos y fisiológicos tremendos.

Quitina. Polisacárido nitrogenado ($C_8H_{13}NO_5$) presente en la cutícula. Muy resistente e insoluble en agua, alcohol, ácidos, sales y enzimas de mamíferos.

Tarso. En la parte final de la pata, suele estar dividido en una serie de artejos o tarsómeros.

Tarsómero. Cada uno de los segmentos en los que se divide el tarso de las patas de los insectos.

Taxonomía. Criterios de clasificación donde se agrupan objetos (individuos, especies o grupos de especies) en clases sobre la base de las propiedades de los objetos que son clasificados. Su función es predominantemente práctica, como metodología para distinguir unos organismos de otros.

Tórax. Parte intermedia de las tres en las que se divide el cuerpo del insecto. En él están las patas y las alas, si es que están presentes. Se divide en protórax, mesotórax y metatórax.

Testículos. Órganos sexuales masculinos productores del esperma.

Tráquea. Las tráqueas son tubos formados por la invaginación del tegumento y que se ramifican por el interior del cuerpo formando las traqueolas, su función es la de llevar oxígeno a las células.

Agradecimientos

Jose Antonio Zavala López y Oscar Reyes Gálvez.

Sección II

Procedimientos normalizados de operación para evaluación de insecticidas para uso en salud pública

José Genaro Ordóñez González, Luis Alberto Cisneros Vázquez
Rosa Patricia Penilla Navarro, Rogelio Danis Lozano
y Américo David Rodríguez Ramírez

Introducción

Los mosquitos son un grupo integrado aproximadamente por 3500 especies de las cuales, *Anopheles* sp. y *Aedes aegypti* resultan ser transmisores de parásitos (malaria) y virus (fiebre amarilla, dengue, chikungunya y Zika), respectivamente. Se estima que más de la mitad de la población mundial está en riesgo de contraer estos agentes infecciosos y tan solo en el 2017 se reportaron 435 000 muertes por malaria, mientras que los virus del dengue, chikungunya y Zika se dispersan a nuevas áreas generando brotes de alto impacto para la salud pública.

Hasta el momento no hay disponibles medicamentos o vacunas efectivas contra estos padecimientos, por lo que muchas de estas enfermedades se previenen a través de estrategias que se enfocan en la reducción de poblaciones del mosquito vector, mediante la educación comunitaria, saneamiento ambiental y la aplicación de insecticidas.

Los insecticidas son plaguicidas que afectan la biología de los insectos y son ampliamente usados en el área de la salud pública; además su efectividad para el control de insectos vectores de enfermedades está ampliamente documentada. En el año 1930 se descubrió la capacidad insecticida de la molécula del DDT y posteriormente se determinó su eficacia para el control de mosquitos y se empleó en los programas de control de malaria. Con el avance del conocimiento y la tecnología se desarrolló una gran variedad de insecticidas como piretroides, organofosforados, carbamatos, reguladores de crecimiento, biológicos, espinosinas, entre otros.

La eficacia de los insecticidas es de suma importancia para su uso en Salud Pública y se evalúa de acuerdo a la fase de vida del insecto al que está dirigido y al modo de aplicación. La aplicación de insecticidas en el control de mosquitos adultos generalmente se realiza mediante rociados espaciales a ultra bajo volumen (en interiores y exteriores), rociados residuales y, en menor medida, se utilizan mosquiteros de cama; en lo que respecta a los estadios inmaduros de los mosquitos, se utilizan larvicidas químicos, reguladores de crecimiento y películas monomoleculares.

Rociados espaciales a ultra bajo volumen en niebla fría: el rociado espacial a ultra bajo volumen (UBV) consiste en la producción de una nube de gotas micropulverizadas de insecticida y se realiza con máquinas generadoras de nieblas frías calibradas para producir gotas, cuyo diámetro fluctúe entre 15 y 25 micras para insecticidas en base oleosa, y de 25 a 30 micras para los de base acuosa. Generalmente se utilizan máquinas de 8-18 caballos de fuerza.

Rociados a ultra bajo volumen en niebla caliente: los rociados a ultra bajo volumen en niebla caliente o termonebulización consiste en la producción de vapores de insecticida que al chocar con el aire frío se condensa para formar una nube densa blanca de niebla con gotas menores de 20µm y la aplicación del insecticida se realiza con un equipo termonebulizador portátil.

Rociados residuales: el rociado residual consiste en la aplicación de un insecticida, mediante bombas aspersoras de compresión de operación manual Tipo Hudson X-Pert de 8-10 litros, en todas las superficies estables internas y externas de las viviendas dejando una cantidad de ingrediente activo que tiene efecto letal residual (4-6 meses) sobre los mosquitos que reposan en las superficies rociadas.

Mosquiteros de cama impregnados con insecticidas: los mosquiteros de cama impregnados con insecticidas de larga duración (MIILD), además de proteger al usuario, tienen la capacidad de disminuir las poblaciones de mosquitos cuando se posan en la superficie. Este tipo de innovaciones se emplean en aquellos lugares donde es difícil realizar rociados residuales.

Larvicidas: los larvicidas son insecticidas dirigidos a la fase inmadura de los mosquitos y se clasifican en químicos, biológicos y misceláneos. De acuerdo a su naturaleza generan una respuesta a diferente intensidad en las larvas de mosquitos. Los larvicidas químicos causan mortalidad aguda (mortalidad en tiempos menores a las 24 horas post-exposición) y residualidad (tiempo que el larvicida sigue siendo efectivo); por su parte en el caso de los larvicidas biológicos y misceláneos, actúan sobre el desarrollo de sus etapas de vida provocando inhibición de la emergencia.

Un componente esencial dentro de las actividades para la evaluación de la eficacia de los insecticidas es la calidad óptima del material biológico (larvas y mosquitos adultos) a utilizarse. Por lo tanto, la cría masiva de mosquitos en insectario es de gran relevancia (ver sección I de este manual).

Prueba de eficacia biológica de adulticidas

PRUEBAS LINEALES

Introducción

El éxito de los programas de prevención y control de vectores de enfermedades se basa en parte al uso de productos insecticidas químicos sintéticos y/o naturales, en formulaciones y presentaciones adecuadas para combatir a los insectos en sus estados inmaduros o larvas (larvicidas) y adultos (adulticidas).

Muchos insecticidas adulticidas son aplicados como nubes espaciales con la utilización de máquinas pesadas (HP) y motomochilas, generadoras de nieblas frías con gotas a Ultra Bajo Volumen (UBV).

Estas nieblas son aplicadas desde el nivel de la calle hacia las áreas intra/peridomiciliares para combatir a los mosquitos *Aedes aegypti* vector de enfermedades como el dengue, chikungunya y Zika.

Para que estos insecticidas sean considerados efectivos tienen que cumplir con muchos requisitos, dentro de los cuales se considera de gran importancia su eficacia biológica en campo. De modo que los insecticidas utilizados en aplicaciones espaciales a Ultra Bajo Volumen (UBV)/ULV (Ultra low volume, por sus siglas en inglés) deben ser evaluados en campo periódicamente.

La evaluación de estos productos se realiza siguiendo guías técnicas estándares, cuyos protocolos permiten generar datos que puedan ser reconocidos (comparables) a nivel internacional, acorde con las normas de buenas prácticas de laboratorio.

Por lo antes mencionado, se presenta el Procedimiento Normalizado de Operación (PNO): Pruebas de eficacia biológica de adulticidas. PRUEBAS LINEALES. Este protocolo ha sido elaborado a partir de guías existentes, manuales y artículos publicados, y puede ser utilizado como una guía técnica para determinar la eficacia biológica de diferentes productos insecticidas adulticidas para aplicación espacial a UBV.

Objetivo

Determinar la eficacia biológica y la efectividad de penetración de la niebla de una formulación de insecticida producida por un equipo pesado generador de nieblas frías con gotas a ultra bajo volumen (UBV), aplicada en áreas a campo abierto, libres de cualquier tipo de obstáculos, contra mosquitos hembras (imago) vectores de ETVs; por ejemplo, la especie *Aedes aegypti*.

Materiales y métodos

Tipo de prueba: Prueba de eficacia biológica de adulticidas. PRUEBAS LINEALES

Lugar del estudio

Las Pruebas Lineales se realizan en áreas abiertas, libres de cualquier tipo de obstáculos (por ejemplo: viviendas, vegetación, muros, etc.). El lugar debe tener un área mínima de una hectárea, de tal manera que permita el trazado de un transecto de 100 metros en línea recta, que tenga vías transitables que permita el recorrido del vehículo con la máquina pesada por cualquiera de los cuatro lados. Ver en anexos un ejemplo de área de estudio.

Coordenadas

Las coordenadas deben ser registradas mediante un Sistema de Posicionamiento Global (GPS por sus siglas en inglés).

Periodo del estudio

En general, para el estudio de un producto, con una formulación, una dosis y una sola especie de mosquitos se realizan tres repeticiones (aplicaciones), una aplicación diaria, lo que en la práctica serían tres días. Sin embargo, cuando las condiciones climáticas y/o de otra índole son adversas, las pruebas pueden tomar más tiempo. Estos estudios deben ser realizados de manera preferente en los meses de secas, ya que las lluvias afectan o impiden la realización de los mismos.

Material biológico

Los mosquitos a utilizarse dependen del objetivo del estudio: los insectos pueden provenir de colectas locales, mosquitos caracterizados como resistentes o susceptibles a insecticidas.

Independientemente del origen de los mosquitos, éstos deben contar con las siguientes características: ser colonizados y criados en un insectario, corresponder a una generación F_1 de la cepa especificada, tener entre 1 y 3 días de edad, estar alimentados con una solución de agua azucarada al 10%, con sus extremidades y alas completas, y en buenas condiciones de vuelo.

Insecticidas

Los productos adulticidas a ser evaluados deben ser formulaciones elaboradas para ser aplicadas como rociados espaciales a UBV. La etiqueta del envase debe contener la siguiente información:

- Nombre comercial del producto
- Nombre del ingrediente activo
- Formulación

- Porcentaje de ingrediente activo (%)
- Solvente
- Número de lote
- Fecha de elaboración
- Fecha de caducidad
- Indicaciones para preparación de la mezcla
- Dosis de aplicación

Preparación de la mezcla

En algunos casos, el producto insecticida puede ser aplicado directamente sin mezclarlo con algún solvente, generalmente sucede con los productos de base oleosa.

En el caso de productos formulados como concentrados emulsionables (CE), estos deben ser mezclados con determinada cantidad de solvente (por ejemplo: diésel), o formulados como emulsiones en agua (EW) que se mezclan con agua. Las indicaciones del tipo de mezcla, solventes, proporciones, etc. se encuentran en la etiqueta del envase del producto formulado.

Equipo de aplicación

La mezcla de insecticida se aplica utilizando un equipo pesado generador de nieblas frías a Ultra Bajo Volumen (UBV)/ULV. Los equipos pesados ideales para este trabajo, son los que tienen un motor de 18 caballos de fuerza (HP), montados sobre vehículo que tengan la capacidad de generar microgotas menores a 50 micras (ver anexo fotográfico).

Antes de cada aplicación de la mezcla de insecticida, se debe calibrar la tasa de descarga de la mezcla (ml/min), y el tamaño de gota en micras (entre 15-30 micras), utilizando un equipo para calibración de tamaño de gotas: DC-IV (KLDLABS Incorporated) (ver anexo fotográfico).

Se sugiere realizar la calibración de la tasa de descarga y el tamaño de gota en el mismo lugar donde se van a realizar las pruebas de campo.

El equipo pesado (HP) debe ser operado y mantenido siguiendo las técnicas y procedimientos sugeridos por la OMS (WHO/CTD/VBC/96/1000).

Aplicación de la mezcla

La mezcla de insecticida se aplica en las horas vespertinas (17:00 – 20:00 h), de acuerdo a las indicaciones sugeridas para los programas de control vectorial y para pruebas de evaluación de insecticidas aplicados a UBV (NORMA Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2002, WHO 1996, WHO 2001, WHO/CTD/VBC/96/1000).

Protección personal

El equipo de trabajo que aplica el insecticida a ULV con máquina pesada, debe usar:

- Uniforme: overol, gorra, camisola, pantalón, botas industriales, chaleco.
- Equipo de protección personal: guantes, mascarilla con filtro, protección auditiva, lentes tipo googles.

Método de evaluación

La eficacia biológica de un insecticida aplicado espacialmente como niebla fría utilizando una máquina pesada (HP) se determina mediante bioensayos exponiendo mosquitos dentro de jaulas, distribuidas a lo largo de un transecto de 100 metros a campo abierto, y verificando la mortalidad provocada por el insecticida a las 24 horas post-exposición.

1. En el área seleccionada, se traza un transecto lineal de 100 metros.
2. En un punto señalado cada 10 metros de distancia se colocan conos de seguridad vial (color naranja) hasta completar los 100 metros de distancia.
3. Dentro de cada cono se plantan postes en forma de “T” (ver fotos ilustrativas en anexos). Lo ideal es que la dirección del transecto lineal con las jaulas esté en dirección paralela a la dirección del viento.
4. En cada poste “T” se cuelga una jaula con mosquitos.
5. En cada jaula se introducen de 10 a 15 mosquitos de la especie/género que se desea evaluar, luego se tapa el orificio de la jaula con algodón para evitar que los mosquitos se escapen.

6. Se colocan conos, con postes “T” y jaulas como controles a una distancia mínima de 100 metros lejos del área de tratamiento.

7. Para transferir los mosquitos a las jaulas de tratamiento y control, se utilizan tubos aspiradores marcados con diferente color para evitar contaminación.

8. A continuación se realiza la aplicación del insecticida, iniciando por uno de los costados del campo (perpendicular a la dirección del viento).

9. El vehículo con la máquina pesada inicia su desplazamiento 100 metros de distancia antes de la hilera de jaulas expuestas.

10. Se desplazará de manera perpendicular al transecto de postes con jaulas de tratamiento, a una velocidad de 10km/h (ver anexo fotográfico).

11. Las horas para la aplicación del insecticida deben estar comprendidas entre las 18:00 – 21:00 horas, cuando las condiciones ambientales de temperatura y humedad son las más adecuadas.

12. Los mosquitos de tratamiento se dejan expuestos a la acción de la nube de insecticida por un tiempo de 30 minutos.

13. Al término de este tiempo se registra el número de mosquitos caídos/”noqueados” (efecto Knock Down), y se transfieren a vasos rotulados, por separado, para cada jaula/distancia.

14. Los mosquitos se dejan en observación durante 24 horas en el laboratorio a una temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa (HR) de $80\% \pm 10\%$.

15. Los mosquitos en laboratorio se mantienen alimentados con una solución de agua azucarada al 10% colocada en un algodón colocado sobre la malla de cada vaso.

16. Después de 12 y 24 horas post-exposición, se cuenta el número de mosquitos muertos y los resultados se anotan en el formato correspondiente. (WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.3) (ver formato para captura de datos).

17. Se calcula el porcentaje de mortalidad en los vasos de expuestos y en los de control. Si la mortalidad en el control es entre 5% y 20%, se debe corregir la mortalidad de exposición utilizando la fórmula de Abbott. Si la mortalidad es mayor de 20%, se deben descartar los resultados (Abbott WS. 1925).

18. Si la prueba se descarta, se debe repetir una vez más.

Este tipo de prueba se debe repetir un mínimo de 3 veces, para tener suficientes resultados para el análisis de datos.

Variables ambientales

Durante cada prueba, se registrarán las condiciones ambientales presentes a nivel de campo: temperatura (°C), humedad relativa (%) y velocidad del viento (km/h).

Captura de datos

Las variables ambientales serán tomadas antes de iniciar y al finalizar cada prueba; asimismo, los resultados del efecto knock down (efecto de derribo), mortalidad a 12 y 24 horas. Los valores se anotarán en los formatos de pruebas lineales (ver formato para captura de datos).

Análisis de resultados

Para el análisis de los resultados de las pruebas (para una especie, un insecticida y una dosis) se emplea un análisis de la varianza de una vía.

Equipos y materiales para las pruebas lineales

Para este tipo de pruebas, se utilizan los siguientes equipos y materiales:

- Equipo pesado generador de nieblas fría de 20 caballos de fuerza (HP).
- Postes “Ts” de tubo PVC, para colgar las jaulas con mosquitos.
 - Conos de tránsito naranjas para soporte de “Ts”.
 - Equipo de protección personal para manejo y aplicación de insecticidas.
 - Material biológico, género y especie de mosquitos de acuerdo al tipo de estudio (*Anopheles* spp.; *Aedes* spp.).
 - Jaulas para exposición de mosquitos.
- Tubos aspiradores rectos y curvos con filtro de aire, para manejo de mosquitos.
 - Vasos de cartón encerado / plástico.
 - Malla mosquitera fina para tapar/cubrir los vasos.
 - Ligas de hule.
 - Marcadores, lápiz.
 - Masking tape para etiquetado de jaulas, vasos, etc.
 - Termo-higrómetro.
 - Anemómetro.
 - Tabla de campo.
 - Formatos para registro de datos.
 - Linternas de mano.
 - Azúcar.
 - Algodón.
 - Agua.
 - Alcohol isopropílico.
- 1 vehículo para transporte de personal, material biológico y materiales de campo.
 - 1 vehículo para transporte de máquina pesada (HP) e insecticidas a campo.
 - 1 equipo DC-IV para medición y calibración de tamaño de gota.
 - 1 probeta graduada de vidrio y 1 cubeta plástica, para calibrar tasa de descarga.
 - Gasolina para máquina pesada y vehículos de transporte.

Referencias

1. Abbott WS. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol.* 1925;18:265-267.
2. Bengoa M, Eritja R, Lucientes J. Ground ultra-low volume adulticiding field trials using pyrethroids against *Aedes albopictus* in the Baix Llobregat region, Spain. *J Am Mosq Control Assoc.* 2014;30(1):42-50.
3. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2002, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector. México: Diario Oficial de la Federación, 2002.
4. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector. México: Diario Oficial de la Federación, 2011.
5. Secretaría de Salud. Lineamientos para la evaluación de insecticidas para su uso en el control de enfermedades transmitidas por vectores. México: SS, CENAPRECE, 2014.

6. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores. México: Diario Oficial de la Federación, 2015.
7. Secretaría de Salud. Equipos de Protección y Uniformes recomendados por el CENAPRECE para Personal del Programa de Prevención y Control de Enfermedades Transmitidas por Vector. México: SS, CENAPRECE, 2015.
8. Secretaría de Salud. Guía de nebulización (rociado espacial) para la aplicación de insecticidas a ultra bajo volumen (UBV) con equipo pesado. México: SS, CENAPRECE.
9. Secretaría de Salud. Guía para determinar la susceptibilidad y/o resistencia de mosquitos a insecticidas. México: SS, CENAPRECE, 2010.
10. Organización Mundial de la Salud. WHO informal consultation on the "Evaluation and testing of insecticides". Ginebra: OMS, 1996.
11. Organización Mundial de la Salud. Operational manual on the application of insecticides for control of the mosquito vectors of malaria and other diseases. Ginebra: OMS, 2001.
12. Organización Mundial de la Salud. Guía práctica. Pulverización de insecticidas en el aire para la lucha contra los vectores y las plagas de la salud pública. Ginebra: OMS, 2003.
13. Organización Mundial de la Salud. Space spray application of insecticides for vector and public health pest control A practitioner's guide. Ginebra: WHO, 2003.
14. Organización Mundial de la Salud. Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance Sixth edition. Ginebra: OMS, 2006.
15. Organización Mundial de la Salud. Guidelines for efficacy testing of insecticides for indoor and outdoor ground-applied space spray applications. Ginebra: WHO, 2009.
16. Organización Mundial de la Salud. Equipment for vector control specification guidelines, second edition. Ginebra: OMS, 2018.

Anexo fotográfico

Fotografías: José Genaro Ordóñez González.



Foto 001 Equipo pesado (HP) generador de nieblas frías a Volumen Ultra Bajo (UBV).



Foto 002 Equipo DC-IV (KDLABS Incorporated) para calibrar el tamaño de gota.



Foto 003 Anemómetro y termohigrómetro.



Foto 004 Calibración del tamaño de gota.



Foto 005 Calibración de la tasa de descarga del producto.



Foto 006 Jaulas para exposición de mosquitos en campo.



Foto 007 Material biológico.



Foto 008 Colocación de jaulas con mosquitos.



Foto 009 Área de pruebas y jaulas colocadas de 10m – 100m.



Foto 010 Aplicación del producto.



Foto 011 Área de reposo y observación de mosquitos, para lectura de mortalidad a 24 horas post-exposición: mosquitos expuestos y mosquitos control.



Foto 012 Vasos de reposo y observación post exposición en laboratorio.

Anexo

Formato de captura de datos

Prueba de eficacia biológica de adulticidas PRUEBAS LINEALES

Fecha:	Hora:	Repetición:
Tiempo de exposición:		Dosis:
Nombre comercial:		Mezcla:
Ingrediente activo:		Tasa de descarga:
Velocidad del viento:	Temperatura:	Humedad Relativa:
Insecto (Género, especie):		Hembras por jaula:
Equipo utilizado:		RPM:
Tamaño de gota:	Velocidad del vehículo:	

RESULTADOS DE MOSQUITOS EXPUESTOS

Núm. jaula	Distancia de la jaula (m)	Número de mosquitos expuestos	Núm. mosquitos caídos a 30 minutos de exposición	Núm. mosquitos caídos a 12 horas de exposición	Núm. de mosquitos muertos a 24 horas de exposición
1	10				
2	20				
3	30				
4	40				
5	50				
6	60				
7	70				
8	80				
9	90				
10	100				

RESULTADOS MOSQUITOS CONTROL

Núm. Jaula	Número de mosquitos en el control.	Núm. de mosquitos caídos a 30 min.	Núm. de mosquitos caídos a 12 horas	Núm. de mosquitos muertos a 24 horas
1				
2				
3				
4				

Prueba de eficacia biológica de adulticidas

PRUEBAS CON OBSTÁCULOS

Introducción

El éxito de los programas de prevención y control de vectores de enfermedades se basa en parte al uso de productos insecticidas químicos sintéticos y/o naturales, en formulaciones y presentaciones adecuadas para combatir a los insectos en sus estados inmaduros o larvas (larvicidas) y adultos (adulticidas).

Muchos insecticidas adulticidas son aplicados como nubes espaciales por medio de la utilización de máquinas pesadas (HP) y motomochilas, generadoras de nieblas frías con gotas a Ultra Bajo Volumen (UBV).

Estas nieblas son aplicadas desde el nivel de la calle hacia las áreas intra/peridomiciliares para combatir a los mosquitos *Aedes aegypti* vector de enfermedades como el dengue, chikungunya y Zika.

Para que estos insecticidas sean considerados efectivos deben cumplir con muchos requisitos, dentro de los cuales se considera de gran importancia su eficacia biológica en campo; por lo cual, los insecticidas a ser utilizados en aplicaciones espaciales a UBV/ULV (Ultra Low Volume, por sus siglas en inglés), deben ser evaluados en campo periódicamente.

La evaluación de estos productos se realiza siguiendo guías técnicas estándares, cuyos protocolos permitan generar datos que puedan ser reconocidos (comparables) a nivel internacional, acorde con las normas de buenas prácticas de laboratorio.

Por lo antes mencionado, se presenta el Procedimiento Normalizado de Operación (PNO): Pruebas de eficacia biológica de adulticidas. PRUEBAS CON OBSTÁCULOS. Este protocolo ha sido elaborado a partir de guías existentes, manuales y artículos publicados (ver referencias), y puede ser utilizado como una guía técnica para determinar la eficacia biológica de productos insecticidas adulticidas para aplicación espacial a UBV.

Objetivo

Determinar la eficacia biológica y la efectividad de penetración una niebla fría de una formulación de insecticida producida por un equipo pesado generador de nieblas frías, con gotas a ultra bajo volumen (UBV), aplicadas en áreas intra y peridomiciliares, contra mosquitos hembras (imágenes) vectores de ETV's, por ejemplo la especie *Aedes aegypti*.

Materiales y métodos

Tipo de prueba que se realiza: Prueba de eficacia biológica de adulticidas. PRUEBAS CON OBSTÁCULOS

Lugar del estudio

Se realizan en áreas pobladas que tengan manzanas de dimensiones regulares (idealmente 100 x 100m), con suficientes viviendas que puedan ser seleccionadas al azar y contar con calles transitables para el vehículo con la máquina pesada. Ver en anexos un ejemplo de área de estudio.

Coordenadas

Las coordenadas deben ser registradas mediante un Sistema de Posicionamiento Global (GPS por sus siglas en inglés).

Periodo del estudio

En general, para el estudio de un producto con una formulación, una dosis y una sola especie de mosquitos se realizan un mínimo de tres repeticiones (aplicaciones), una aplicación diaria, lo que en la práctica serían tres días. Sin embargo, cuando las condiciones climáticas y/o de otra índole son adversas, las pruebas pueden tomar más tiempo. Se recomienda realizar este tipo de estudios durante los meses de secas, ya que las lluvias afectan o impiden la realización de las pruebas.

Material biológico

Los mosquitos a utilizarse pueden provenir de cepas locales, cepas caracterizadas como resistentes o, susceptibles (e.g.: cepa Rockefeller, cepa New Orleans). Independientemente de la cepa, los mosquitos serán colonizados y criados en un insectario. Los estudios se realizan con mosquitos correspondientes a la generación F_1 de la cepa especificada, deberán tener entre 1 y 3 días de edad, estar alimentados con una solución de agua azucarada al 10%, con sus extremidades y alas completas, y en buenas condiciones de vuelo (ver anexo fotográfico de PRUEBAS LINEALES, Foto 006-007).

Insecticidas

Los productos adulticidas a ser evaluados, deben ser formulaciones elaboradas para ser aplicadas como rociados espaciales a UBV. La etiqueta del envase debe contener la siguiente información:

- Nombre comercial del producto
- Nombre del ingrediente activo
- Formulación
- Porcentaje de ingrediente activo (%)

- Solvente
- Número de lote
- Fecha de elaboración
- Fecha de caducidad
- Indicaciones para preparación de la mezcla
- Dosis de aplicación

Preparación de la mezcla del producto

En algunos casos, el producto insecticida será aplicado directamente sin mezclarlo con algún solvente, generalmente son productos de base oleosa.

En el caso de los productos formulados como concentrados emulsionables (CE) deben ser mezclados con determinada cantidad de solvente (diésel), o con agua (emulsiones EW para mezcla con agua). Las indicaciones del tipo de mezcla, solventes, proporciones, etc. se encuentran en la etiqueta del envase del producto formulado.

Equipo de aplicación

La mezcla de insecticida se aplica utilizando un equipo pesado generador de nieblas frías a volumen ultra reducido (VUR)/Ultra bajo volumen (ULV por sus siglas en inglés). Los equipos pesados ideales para este trabajo son los que tienen un motor de 18 caballos de fuerza (HP), montados sobre vehículo (ver anexo fotográfico de PRUEBAS LINEALES, Foto 001-005), que tengan la capacidad de generar microgotas.

Antes de cada aplicación de la mezcla de insecticida, se debe calibrar la tasa de descarga de la mezcla (ml/min), así como el tamaño de gota en micras (entre 15-30 micras) utilizando un equipo para calibración de tamaño de gotas: DC-III / DC-IV (KLDLABS Incorporated) (ver anexo fotográfico).

Se sugiere realizar la calibración de la tasa de descarga y el tamaño de gota en el mismo lugar donde se van a realizar las pruebas de campo.

El equipo debe ser operado y mantenido siguiendo las técnicas y procedimientos sugeridos por la OMS (WHO/C'TD/VBC/96/1000).

Aplicación

La mezcla de insecticida se aplica en las horas vespertinas (17:00–20:00h), de acuerdo a las indicaciones sugeridas por la SSA en los programas de control vectorial según lo establecido en la NORMA Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2002 para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector, y por la Organización Mundial de la Salud (WHO 1996, WHO 2001, WHO/CTD/VBC/96/1000) para pruebas de evaluación de insecticidas aplicados a UBV/ULV.

Protección personal

El equipo de trabajo que aplica el insecticida a UBV con máquina pesada, debe usar uniforme y el siguiente equipo de seguridad personal:

- Uniforme: overol, gorra, camisola, pantalón, botas industriales, chaleco.
- Equipo de protección personal: guantes, mascarilla con filtro, protección auditiva, lentes tipo goggles.

Método de evaluación

1. Se seleccionan cuatro manzanas, de preferencia ubicadas de manera contigua y se seleccionan cuatro viviendas por manzana, una por cada lado de la manzana (un total de 16 viviendas).
2. Se llenan jaulas con 15-25 mosquitos.
3. Se coloca una jaula en la recámara, una en la cocina y una en el patio trasero de la casa. Las jaulas no deben colocarse en el piso ni en lugares que representen obstáculos para el ingreso y acción de la nube de insecticida.
4. Durante la prueba, las casas deben permanecer con puertas y ventanas abiertas.
5. Adicionalmente a las 16 viviendas en las manzanas de tratamiento, se seleccionan cuatro viviendas como controles, a una distancia de 200m y en contra de la dirección del viento del área de estudio, las cuales no serán tratadas con insecticidas.
6. A continuación se aplica el insecticida desde el nivel de la calle con el equipo pesado generador de niebla fría a ULV.

7. El vehículo debe circular alrededor de las manzanas a una velocidad de 10km/h.

8. Las horas para la aplicación del insecticida deben estar entre las 18:00–21:00 horas, cuando las condiciones ambientales de temperatura y humedad son las más adecuadas.

9. Las jaulas con los mosquitos quedan expuestas al efecto del producto insecticida nebulizado por un tiempo de 60 minutos.

10. Al término de este tiempo se toman lecturas del efecto de derribo (efecto knock down) de los mosquitos en las jaulas de exposición y controles, posteriormente los mosquitos se llevarán al laboratorio y se transfieren a vasos de recuperación.

11. Los mosquitos se mantienen alimentados con una solución de agua azucarada al 10% colocada en un algodón colocado sobre la malla de cada vaso, y se dejan en observación durante 24 horas en el laboratorio a una temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa (HR) de $80\% \pm 10\%$.

12. Después de 12 y 24 horas post-exposición, se cuenta el número de mosquitos muertos se calcula el porcentaje de mortalidad en los vasos de expuestos y en los de control (WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.3).

13. Si la mortalidad en el control es entre 5% y 20%, se debe corregir la mortalidad de exposición utilizando la fórmula de Abbott, descrita anteriormente. Si la mortalidad es mayor de 20%, se deben descartar los resultados y repetir el estudio.

Esta prueba debe repetirse un mínimo de 3 veces.

VARIABLES AMBIENTALES

Durante cada prueba, se registrarán las condiciones ambientales presentes a nivel de campo: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), humedad relativa (%) y velocidad del viento (km/h).

Captura de datos

Las variables ambientales serán tomadas antes de iniciar y al finalizar cada prueba respectivamente; asimismo, los resultados del Efecto Knock Down (efecto de derribo), mortalidad a 12 y 24 horas. Los valores se anotarán en los formatos de pruebas con obstáculos (ver formato A).

Análisis de resultados

Para el análisis de los resultados de las pruebas (para una especie, un insecticida y una dosis) se emplea un análisis de la varianza de una vía.

Materiales utilizados en las pruebas

Para este tipo de pruebas, se utilizan los siguientes equipos y materiales:

- Equipo pesado generador de nieblas fría (HP).
- Cruces “Ts” de tubos PVC para colgar las jaulas con mosquitos.
- Conos de tránsito naranjas para soporte de “Ts”.
- Equipo de protección personal para manejo y aplicación de insecticidas.
- Material biológico, género y especie de mosquitos de acuerdo al tipo de estudio (*Anopheles* spp.; *Aedes* spp.).
- Jaulas para exposición de mosquitos.
- Tubos aspiradores normales y tubos aspiradores curvos con filtro de aire, para manejo de mosquitos.
- Vasos de plástico/cartón encerado.
- Malla mosquitera fina para tapas de vasos.
- Hules/ligas.
- Marcadores, lápiz.
- Termo-higrómetro.
- Anemómetro.
- Tabla de campo.
- Formatos para registro de datos.
- Linternas de mano.
- Azúcar.
- Algodón.
- Agua.
- Alcohol isopropílico.
- 1 vehículo para transporte de personal, material biológico y materiales de trabajo en campo.
- 1 vehículo para transporte de máquina pesada (HP) e insecticidas a campo.
- 1 equipo DC-IV para medición y calibración de tamaño de gota.
- 1 probeta graduada de vidrio y 1 cubeta plástica, para calibrar tasa de descarga.
- Gasolina.

Referencias

1. Abbott WS. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol.* 1925;18:265-267.
2. Bengoa M, Eritja R, Lucientes J. Ground ultra-low volume adulticiding field trials using pyrethroids against *Aedes albopictus* in the Baix Llobregat region, Spain. *J Am Mosq Control Assoc.* 2014;30(1):42-50.
3. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2002, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector. México: Diario Oficial de la Federación, 2002.
4. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector. México: Diario Oficial de la Federación, 2011.
5. Secretaría de Salud. Lineamientos para la evaluación de insecticidas para su uso en el control de enfermedades transmitidas por vectores. México: SS, CENAPRECE, 2014.
6. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores. México: Diario Oficial de la Federación, 2015.
7. Secretaría de Salud. Equipos de Protección y Uniformes recomendados por el CENAPRECE para Personal del Programa de Prevención y Control de Enfermedades Transmitidas por Vector. México: SS, CENAPRECE, 2015.
8. Secretaría de Salud. Guía de nebulización (rociado espacial) para la aplicación de insecticidas a ultra bajo volumen (UBV) con equipo pesado. México: SS, CENAPRECE.
9. Secretaría de Salud. Guía para determinar la susceptibilidad y/o resistencia de mosquitos a insecticidas. México: SS, CENAPRECE, 2010.
10. Organización Mundial de la Salud. Report of the WHO informal consultation on the “Evaluation and testing of insecticides”. Ginebra: OMS, 1996.
11. Organización Mundial de la Salud. Operational manual on the application of insecticides for control of the mosquito vectors of malaria and other diseases. Ginebra: OMS, 2001.
12. Organización Mundial de la Salud. Guía práctica. Pulverización de insecticidas en el aire para la lucha contra los vectores y las plagas de la salud pública. Ginebra: WHO, 2003.
13. Organización Mundial de la Salud. Space spray application of insecticides for vector and public health pest control A practitioner’s guide. Ginebra: OMS, 2003.
14. Organización Mundial de la Salud. Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance Sixth edition. Ginebra: OMS, 2006.
15. Organización Mundial de la Salud. Guidelines for efficacy testing of insecticides for indoor and outdoor ground-applied space spray applications. Ginebra: OMS, 2009.
16. Organización Mundial de la Salud. 2018. Equipment for vector control specification guidelines, second edition. Ginebra: OMS, 2018.

Anexo fotográfico

Fotografías: José Genaro Ordóñez González.



Foto 001 Equipo pesado (HP) generador de nieblas frías a Volumen Ultra Bajo (UBV).



Foto 002 Equipo DC-IV (KDLABS Incorporated) para calibrar el tamaño de gota.



Foto 003 Anemómetro y termohigrómetro.



Foto 004 Calibración del tamaño de gota.



Foto 005 Calibración de la tasa de descarga del producto.



Foto 006 Jaulas para exposición de mosquitos en campo.



Foto 007 Material biológico.



Foto 013 Representación esquemática del área de rociado espacial a UBV y distribución de viviendas con jaulas de mosquitos expuestas y control para el estudio experimental.



Recámara



Patio



Cocina

Foto 013 Colocación y ubicación de jaulas con mosquitos.



Foto 015 Aplicación del producto y medición de condiciones ambientales.



Foto 011 Área de reposo y observación de mosquitos, para lectura de mortalidad a 24 horas post-exposición: mosquitos expuestos y mosquitos control.



Foto 016 Vasos de observación y vasos de control.

Anexo

Formato de captura de datos

Prueba de eficacia biológica de adulticidas PRUEBAS CON OBSTÁCULOS

Fecha:	Hora:	Repetición:
Tiempo de exposición:		Dosis:
Nombre comercial:		Mezcla:
Ingrediente activo:		
Velocidad del viento:	Temperatura:	Humedad Relativa:
Insecto:	Hembras por jaula:	
Equipo utilizado:		RPM:
Tamaño de gota:	Velocidad del vehículo:	

RESULTADOS DE MOSQUITOS EXPUESTOS

Número de casa Nombre Dirección	Núm. Jaula	Ubicación de las jaulas	Núm. de mosquitos expuestos	Núm. mosquitos caídos a 60 min. de exposición	Núm. Mosquitos caídos a 12 h de exposición	Núm. de mosquitos muertos a 24 h de Exposición
Casa Núm.	1	Recámara	15			
	2	Cocina	15			
	3	Patio	15			
Casa Núm.	1	Recámara	15			
	2	Cocina	15			
	3	Patio	15			
Casa Núm.	1	Recámara	15			
	2	Cocina	15			
	3	Patio	15			
Casa Núm.	1	Recámara	15			
	2	Cocina	15			
	3	Patio	15			

RESULTADOS MOSQUITOS CONTROL

Casa Núm.	Núm. Jaula	Ubicación de las jaulas	Número de mosquitos en el control	Núm. de mosquitos caídos a 60 min.	Núm. mosquitos caídos a 12 horas	Núm. de mosquitos muertos a 24 horas
	1	Recámara	15			
	2	Cocina	15			
	3	Patio	15			
	4	Recámara	15			
	5	Cocina	15			
	6	Patio	15			

Prueba de eficacia biológica de adulticidas

PRUEBAS DE CONTACTO/PARED

Introducción

El éxito de los programas de prevención y control de vectores de enfermedades se basa en parte al uso de productos insecticidas químicos sintéticos y/o naturales, en formulaciones y presentaciones adecuadas para combatir a los insectos en sus estados inmaduros o larvas (larvicidas) y adultos (adulticidas).

Los insecticidas adulticidas de acción residual son aplicados para el control de mosquitos, en especial del Género *Anopheles* (vector de malaria), y en mosquitos del Género *Aedes* (vector del dengue, chikungunya y Zika); asimismo, para combatir a los insectos Triatóminos transmisores de la enfermedad de Chagas. Su aplicación se realiza utilizando bombas de compresión manual en las paredes internas y externas de las viviendas y anexos donde estos insectos pudieran posarse o descansar.

La eficacia biológica, mortalidad aguda y efecto residual de estos insecticidas deben ser evaluados periódicamente, antes de su utilización en los Programas de Prevención y Control de Vectores.

La evaluación de estos productos se realiza siguiendo guías técnicas estándares, cuyos protocolos permitan generar datos que puedan ser reconocidos (comparables) a nivel internacional, acorde con las normas de buenas prácticas de laboratorio.

Por lo antes mencionado se presenta el Procedimiento Normalizado de Operación (PNO): Pruebas de eficacia biológica de adulticidas. PRUEBAS DE CONTACTO / PARED. Este protocolo ha sido elaborado a partir de guías

existentes, manuales y artículos publicados, y puede ser utilizado como una guía técnica para determinar la eficacia biológica de diferentes productos insecticidas adulticidas de acción residual.

Objetivo

Determinar la eficacia biológica: mortalidad aguda y efecto residual insecticida de las formulaciones de insecticidas adulticidas aplicadas como rociado residual en diferentes superficies/sustratos/paredes, contra mosquitos hembras (imago) vectores de ETVs, por ejemplo de los géneros *Anopheles* spp. y *Aedes* spp.

Materiales y métodos

Tipo de prueba: Prueba de eficacia biológica de adulticidas: PRUEBAS DE CONTACTO/PARED

Lugar de estudio

Este tipo de estudios pueden realizarse a nivel de laboratorio, semi-campo, y campo, dependiendo de los objetivos y recursos disponibles. Cuando se realizan a nivel de laboratorio y semi-campo, se desarrollan en áreas aisladas, con buena ventilación y protegidas de la lluvia.

Coordenadas

Las coordenadas deben ser registradas mediante un Sistema de Posicionamiento Global (GPS por sus siglas en inglés).

Periodo del estudio

Los estudios tienen una duración mínima de cuatro meses. De acuerdo con las especificaciones del producto pueden evaluarse por un periodo mayor. En algunas ocasiones, cuando los estudios que se realizan son a nivel intradomiliar pueden ser desarrollados en cualquier época del año (de acuerdo a los objetivos).

Material biológico

Los mosquitos a utilizarse dependen del objetivo del estudio: los insectos pueden provenir de colectas locales, mosquitos caracterizados como resistentes o susceptibles a insecticidas.

Independientemente del origen de los mosquitos, éstos deben contar con las siguientes características: ser colonizados y criados en un insectario, corresponder a una generación F1 de la cepa especificada, tener entre 1 y 3 días de edad, estar alimentados con una solución de agua azucarada al 10%, con sus extremidades y alas completas, y en buenas condiciones de vuelo.

Insecticidas

Los productos adulticidas a evaluarse deben ser formulaciones elaboradas para su aplicación como rociado residual. La etiqueta del envase debe contener la siguiente información:

- Nombre comercial del producto
- Nombre del ingrediente activo
- Formulación
- Porcentaje de ingrediente activo (%)
- Solvente
- Número de lote
- Fecha de elaboración
- Fecha de caducidad
- Indicaciones para preparación de la mezcla
- Dosis de aplicación

Preparación de la mezcla del producto

En algunos casos, el producto insecticida debe ser aplicado directamente sin mezclarlo con algún solvente, generalmente son productos de base oleosa.

En el caso de productos formulados como concentrados emulsionables (CE) deben ser mezclados con determinada cantidad de solvente (por ejemplo: diésel), o formulados como emulsiones en agua (EW). Las indicaciones del tipo de mezcla, solventes, proporciones, etc. se encuentran en la etiqueta del envase del producto formulado.

Equipo de aplicación

La aplicación del insecticida se realiza utilizando una bomba aspersora de compresión manual. Se sugiere utilizar una bomba de la marca Hudson X-Pert® o una similar, recomendadas por la OMS (figura 1a).

Aplicación de la mezcla

Para la aplicación de la mezcla de insecticida, la bomba de compresión manual debe contar con una varilla aspersora con una boquilla No. 8002 que genere gotas de un tamaño comprendido en el rango de 100 a 400 micras. La tasa de descarga debe ser de 650 ml/min +10 ml/min de mezcla. La aplicación se realiza siguiendo la técnica de aplicación/pulverización de insecticidas de acción residual de la OMS (WHO 2007): un ángulo de pulverización de 60-65 °, franja horizontal de 75cm, con un traslape de 5cm, mantener la boquilla a una distancia de 45cm de la superficie a rociar (figura 1c). Ver: Manual for Indoor Residual Spraying. Application of Residual Sprays for Vector Control. Third Edition. (WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2007.3).

La concentración y dosis de aplicación será la indicada en la etiqueta del producto.

Protección personal

El personal que aplicará el insecticida, debe utilizar el siguiente equipo de seguridad personal: overol, gorra, botas, guantes, mascarilla, lentes tipo goggles.

Método de evaluación

Se realiza una sola aplicación del producto en las superficies y se deja secar durante 24 horas.

La evaluación del producto rociado en las paredes se realiza siguiendo el procedimiento que se describe a continuación, basado en la guía para evaluar adulticidas para rociado residual (WHO 2006):

1. Se colocan cuatro conos tipo OMS sobre cada superficie rociada (las superficies pueden ser block, cemento, madera y otros sustratos propios de cada región). Los conos se fijan con cinta adhesiva o clavos con ligas, separados uno de otro, a diferentes alturas de la superficie rociada.

2. Se utilizan como controles sustratos de los mismos materiales libres de insecticidas.

3. Mediante el uso de tubos aspiradores bucales, se introducen de 10 a 15 mosquitos de la especie que se desea evaluar y posteriormente se tapa el orificio del cono con algodón o preferiblemente con esferas plásticas adecuadas, para evitar la salida de los mosquitos. Para transferir los mosquitos a los conos control, se utilizan tubos aspiradores para diferentes, marcados con diferente color para evitar contaminación.

4. Los mosquitos se exponen al efecto del insecticida rociado en las paredes por un tiempo específico, generalmente durante 30 minutos.

5. Al término de este tiempo se registra el número de mosquitos caídos/"noqueados" y se transfieren a vasos rotulados con el nombre del sustrato o pared con la que tuvieron contacto. Para evitar la fuga de los mosquitos, los vasos se cubren con malla tul. Posteriormente se coloca un algodón humedecido con agua azucarada sobre la malla de cada vaso, y se dejan en observación durante 24 horas en el laboratorio a una temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa (HR) de $80\% \pm 10\%$.

6. Después de 12 y 24 horas post-exposición se cuenta el número de mosquitos muertos y se calcula el porcentaje de mortalidad en los vasos de expuestos y en los de control (WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.3).

7. Si la mortalidad en el control es entre 5% y 20%, se debe corregir la mortalidad de exposición utilizando la fórmula de Abbott, descrita anteriormente. Si la mortalidad es mayor de 20%, se deben descartar los resultados y repetir la prueba.

Inicialmente se determina la mortalidad aguda a las 24 horas post-rociado, y el efecto residual insecticida de 4 a 6 meses post-rociado. Las pruebas se realizan cada 15 o 30 días y, a menores periodos, dependiendo de los objetivos del estudio.

Este procedimiento se realiza hasta completar 120 días (efecto residual hasta los cuatro meses) o hasta 180 días (seis meses post-rociado).

Variables ambientales

Durante cada prueba, se registrarán las condiciones ambientales presentes: temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa (%).

Captura de datos

Los resultados del Efecto Knock Down (efecto de derribo), mortalidad a 12 y 24 horas. Los valores se anotarán en los formatos de pruebas con obstáculos (ver formato en anexo).

Análisis de resultados

Para el análisis de los resultados de las pruebas (para una especie, un insecticida y una dosis) se emplea un análisis de la varianza de una vía.

Equipos y materiales para las pruebas

Para este tipo de pruebas, se utilizan los siguientes equipos y materiales:

- Bomba de compresión manual marca Hudson X-Pert o una similar.
- Equipo de protección personal para manejo y aplicación de insecticidas utilizados en salud pública.
- Paneles/sustratos/paredes: cemento, block, madera, ladrillo, vitropiso, o cualquier otro sustrato para aplicación de insecticidas de acción residual.
- Material biológico, género y especie de mosquitos de acuerdo al tipo de estudio (*Anopheles* spp./*Aedes* spp.).
- Conos para bioensayos de la OMS.
- Tubos aspiradores rectos y tubos aspiradores curvos, con filtro de aire, para succionar los mosquitos.
- Jaula para mosquitos.

- Vasos de plástico/cartón encerado.
- Malla mosquitera fina para tapas de vasos.
- Hules/ligas.
- Marcadores.
- Lápices de grafito.
- Azúcar.
- Algodón.
- Termo-higrómetro.
- Formatos para registro de datos.
- Tabla de campo.
- Linterna de mano.
- Cubetas de plástico.
- Jarra de plástico graduada.
- Probetas de vidrio graduadas.
- Alcohol.
- Agua.

Referencias

1. Abbott WS. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol.* 1925;18:265-267.
2. Organización Mundial de la Salud. Procedimientos de las pruebas para la vigilancia de la resistencia a los insecticidas en los mosquitos vectores de malaria. Ginebra: OMS, 2018.
3. Ponce G, Cantú P, Flores A, Badii M, Zapata R, López B, Fernández I. Modo de acción de los insecticidas. *Rev Salud Publica Nutr.* 2006;7(4). Disponible en: <https://respyn.uanl.mx/index.php/respyn/article/view/178>
4. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2002. Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector. México: Diario Oficial de la Federación, 2002.
5. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010. Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector. México: Diario Oficial de la Federación, 2010.
6. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014. Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores. México: Diario Oficial de la Federación, 2015.
7. Secretaría de Salud. Guía metodológica para el rociado intradomiciliar. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. México: Diario Oficial de la Federación, 2017.
8. Sin autor. Instantáneas. Diferenciación genética de poblaciones de *Aedes aegypti* en Brasil y su relación con la susceptibilidad a los virus del dengue y de la fiebre amarilla. *Rev Panam Salud Pública/Pan Am J Public Health* 2004; 15(6): 424-425.
9. Williams J, Pinto J. Manual de capacitación en entomología de la malaria para técnicos en entomología y control vectorial (nivel básico). Lisboa: Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional por RTI International, 2012.
10. Organización Mundial de la Salud. Report of the WHO informal consultation on the "Evaluation and testing of insecticides". Ginebra: OMS, 1996.
11. Organización Mundial de la Salud. Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vectors, Bio-Efficacy and Persistence of Insecticides on Treated Surfaces. Ginebra: OMS, 1998.
12. Organización Mundial de la Salud. Operational manual on the application of insecticides for control of the mosquito vectors of malaria and other diseases. Ginebra: OMS, 2001.
13. Organización Mundial de la Salud. Malaria Vector Control. Insecticides for Indoor Residual Spraying. Ginebra: OMS, 2001.
14. Organización Mundial de la Salud. Guidelines for laboratory and field testing of long-lasting insecticidal mosquito nets. Ginebra: OMS, 2005.
15. Organización Mundial de la Salud. Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance. Ginebra: OMS, 2006.
16. Organización Mundial de la Salud. Guidelines for testing mosquito adulticides for Indoor residual spraying and treatment of mosquito nets. Ginebra: OMS, 2006.
17. Organización Mundial de la Salud. Manual for Indoor Residual Sprays. Application of Residual Spraying for Vector Control. Ginebra: OMS, 2007.

Anexo fotográfico

Fotografías: José Genaro Ordóñez González.

Equipo de rociado



Foto 017 Bomba de presión manual.



Foto 019 Calibración con mezcla de insecticida.

Área de evaluación de insecticidas residuales



Block



Cemento



Madera

Foto 020 Aplicación del rociado residual: mezcla del producto insecticida

Pruebas biológicas de contacto/pared con conos (OMS)



Foto 021 Superficies/sustratos rociados, colocación de conos OMS



Foto 022 Exposición de mosquitos a superficies rociadas con insecticidas



Foto 023 Exposición de mosquitos en superficies NO rociadas: CONTROL.



Foto 007 Material biológico.



Foto 024 Vasos de reposo y conservación de mosquitos para lectura de mortalidades.



Foto 011 Área de reposo y observación de mosquitos, para lectura de mortalidad a 24 horas post-exposición: mosquitos expuestos y mosquitos control.
Lectura de mortalidad a 12 y 24 horas post-exposición: mosquitos expuestos y mosquitos control.

Anexo

Formato de captura de datos

**Pruebas de eficacia biológica de adulticidas:
PRUEBAS DE CONTACTO/PARED**

Fecha:	Hora:	Días post-rociado:
Tiempo de exposición:		Dosis:
Nombre comercial:		Mezcla:
Ingrediente activo:		Tasa de descarga:
Temperatura:		Humedad Relativa:
Insecto:		Hembras por cono:
Equipo para rociado residual:		Boquilla:
Tamaño de gota:		

RESULTADOS DE MOSQUITOS EXPUESTOS

Tipo de superficie	Núm. Cono	Núm. de mosquitos expuestos	Núm. mosquitos caídos a 30 minutos post-exposición	Núm. mosquitos muertos a 12 horas post-exposición	Núm. de mosquitos muertos a 24 horas post-exposición
BLOCK	1	15			
	2	15			
	3	15			
	4	15			
CEMENTO	1	15			
	2	15			
	3	15			
	4	15			
MADERA	1	15			
	2	15			
	3	15			
	4	15			
CONTROL	1	15			
	2	15			
	3	15			
	4	15			

Prueba de eficacia biológica de adulticidas

PRUEBAS DE CONTACTO/PARED para adulticidas incorporados en mosquiteros de cama

Introducción

Dentro de los programas de salud para la prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores (ETVs), mediante la participación comunitaria, se implementan estrategias enfocadas a disminuir las poblaciones de los insectos vectores; esto por medio de educación comunitaria sobre saneamiento ambiental y aplicación de medidas físicas como: tratamiento de criaderos, mejoramiento de la vivienda, y utilización de pabellones impregnados con insecticidas para evitar el contacto hombre-vector.

En muchos casos, factores físicos como la estructura de las viviendas (paredes discontinuas, aberturas y grietas, celosías, falta de mallas mosquiteras en puertas y ventanas) son suficientes para el ingreso de los vectores, reduciendo la efectividad del control químico (rociado residual tradicional). El uso de mosquiteros de cama impregnados con insecticidas de larga duración (MIILD) conocidos también como pabellones, toldillos, toldos, forma parte importante del control integrado de vectores.

Estos mosquiteros reciben un tratamiento con insecticidas durante su fabricación, y presentan resistencia al lavado, el insecticida impregnado mantiene su actividad insecticida después de varias lavadas y por un periodo de tiempo prolongado en condiciones de campo.

Como todo producto utilizado en salud pública para la prevención de ETVs, los mosquiteros de cama (MIILD) deben ser evaluados periódicamente. La evaluación de estos productos se realiza siguiendo guías técnicas estándar,

que permitan generar datos que puedan ser reconocidos (comparables) a nivel internacional, acorde con las normas de buenas prácticas de laboratorio.

Por lo antes mencionado se presenta el Procedimiento Normalizado de Operación (PNO): pruebas de eficacia biológica de adulticidas: PRUEBAS DE CONTACTO/PARED para adulticidas incorporados en mosquiteros de cama (MIILD). Este protocolo puede ser utilizado como una guía técnica para determinar la eficacia biológica de diferentes mosquiteros de cama MIILD.

Objetivo

Determinar la eficacia biológica y la acción residual de los insecticidas adulticidas impregnados en mosquiteros de cama (MIILD), contra mosquitos hembras (imago) vectores de ETV's; por ejemplo, de los géneros *Anopheles* spp. y *Aedes* spp.

Materiales y métodos

Tipo de prueba: PRUEBAS DE CONTACTO/PARED para adulticidas incorporados en mosquiteros de cama (MIILD).

Lugar del estudio

Este tipo de estudios pueden ser realizados a nivel de semi-campo/campo, dependiendo de los recursos disponibles. En general se realizan en instalaciones con áreas aisladas, con buena ventilación y protegidas de la lluvia.

Coordenadas

Las coordenadas deben ser registradas mediante un Sistema de Posicionamiento Global (GPS por sus siglas en inglés).

Periodo del estudio

Puede ser realizado en un periodo de 2 a 3 meses.

Material biológico (mosquitos)

Los mosquitos a utilizarse pueden provenir de colectas locales y/o mosquitos caracterizados como resistentes o susceptibles a insecticidas.

Los mosquitos deben contar con las siguientes características: ser colonizados y criados en un insectario correspondientes a la generación F_1 de la cepa especificada, tener entre 1 y 3 días de edad, estar alimentados con una solución de agua azucarada al 10%, con sus extremidades y alas completas, y en buenas condiciones de vuelo.

Producto a evaluar

Los mosquiteros de cama (MIILD) a evaluarse, deben contener la siguiente información:

- Nombre comercial del producto (MIILD).
- Nombre del ingrediente activo.
- Dosis de ingrediente activo por m^2 de tela.
- Número de lote.
- Fecha de elaboración.
- Fecha de caducidad.
- Indicaciones de uso y lavado.

Método de evaluación

La eficacia biológica y efecto residual de los insecticidas impregnados en mosquiteros de cama de larga duración (MIILD) se determina mediante bioensayos de contacto/pared recomendados por la OMS (WHO 2006, WHO/HTM/NTD/WHOPES/2013.3) usando conos y metodología estándares (WHO 1975).

Bioensayo 1

- Con la ayuda de unas tijeras se corta aleatoriamente cuatro muestras (dimensión de 25 x 25cm cada corte) de la tela del mosquitero de cama
- Cada recorte se sujeta sobre un tablero de madera/cartón/corcho, bien extendidos, que permita la colocación de los conos estándar OMS.
- Colocar conos estándar OMS sobre los recortes de tela, sujetados con la ayuda de tachuelas o chinchonetas.
- Introducir de 10 a 15 mosquitos hembras adultos en cada cono y dejarlos durante 3 minutos en contacto con los recortes de MIILD.
- Como testigo (control) se exponen mosquitos a un recorte de un mosquitero de cama sin insecticida, siguiendo el mismo procedimiento del punto anterior.
- Después de los tres minutos de exposición, los mosquitos se transfieren a vasos. Para evitar la fuga de los mosquitos, los vasos se cubren con malla tul.
- A los 30 minutos post-exposición se registra el número de mosquitos caídos (efecto knock down).
- Los vasos con los mosquitos se llevan al laboratorio de reposo y observación (temperatura de $27\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ y una humedad relativa de $80\% \pm 10\%$), se coloca un algodón humedecido con agua azucarada sobre la malla de cada vaso, y se dejan en observación durante 24 horas
- Los recortes de tela utilizados en las pruebas son etiquetados y guardados en papel aluminio de manera individual, mantenidos en un lugar oscuro y seco, hasta realizar los lavados y la siguiente prueba.
- Se registra la mortalidad después de 12 y 24 horas post-exposición; también se calcula el porcentaje de mortalidad en los vasos de expuestos y en los de control (WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.3).
- Si la mortalidad en el control está entre 5% y 20%, se debe corregir la mortalidad de exposición utilizando la fórmula de Abbott, descrita anteriormente. Si la mortalidad es mayor de 20%, se deben descartar los resultados y repetir la prueba.

Bioensayo 2

Se realizan cinco lavados a los recortes utilizados en el bioensayo anterior (ver el procedimiento de lavado en anexo). Se repite la exposición de mosquitos como se describe en el Bioensayo 1.

Bioensayo 3

Se realizan cinco lavados más a los recortes utilizados en el bioensayo anterior (10 lavados acumulados), 24 horas después del último lavado se repite la exposición de mosquitos como se describe en el Bioensayo 1.

Bioensayo 4

Se realizan cinco lavados más a los recortes utilizados en el bioensayo anterior (15 lavados acumulados), 24 horas después del último lavado se repite la exposición de mosquitos como se describe en el Bioensayo 1.

Bioensayo 5

Se realizan cinco lavados más a los recortes utilizados en el bioensayo anterior (20 lavados acumulados), 24 horas después del último lavado se repite la exposición de mosquitos como se describe en el Bioensayo 1.

Variables ambientales

Durante cada prueba, se registran las condiciones ambientales presentes: temperatura (°C) y humedad relativa (%).

Protección personal

El personal que manipulará los mosquiteros de cama debe utilizar bata de laboratorio y guantes de látex.

Captura de datos

Las variables ambientales serán tomadas antes de iniciar y al finalizar cada prueba respectivamente; asimismo, los resultados del Efecto Knock Down (efecto de derribo), mortalidad a 12 y 24 horas. Los resultados se anotarán en los formatos diseñados para este tipo de pruebas (ver formato en anexo).

Análisis de resultados

Para el análisis de las pruebas (para una especie y un mosquitero) se emplea análisis de la varianza de una vía.

Materiales necesarios para las pruebas

Para este tipo de pruebas se utilizan los siguientes equipos y materiales:

- Equipo de protección personal: bata de laboratorio y guantes de látex.
- Paneles de madera/cartón/corcho para sujetar los recortes de tela de los mosquiteros de cama (MILD).
- Material biológico: mosquitos de acuerdo al tipo de estudio (*Anopheles* spp.; *Aedes* spp.).
- Conos para bioensayos de la OMS.
- Tubos aspiradores rectos y tubos aspiradores curvos, con filtro de aire, para succionar los mosquitos.
- Vasos de plástico/cartón encerado.
- Malla mosquitera fina para tapar los vasos.
- Hules/ligas.
- Marcadores.
- Lápices de grafito.
- Azúcar.
- Algodón.
- Termo-higrómetro.
- Formatos para registro de datos.
- Tablas de campo.
- Linterna de mano.

Referencias

1. Abbott WS. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol.* 1925;18:265-267.
2. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores. México: Diario Oficial de la Federación, 2015.
3. Organización Mundial de la Salud. Report of the WHO informal consultation on the "Evaluation and testing of insecticides". Ginebra: OMS, 1996.
4. Organización Mundial de la Salud. Pesticides and their application: for the control of vectors and pests of public health importance. Ginebra: OMS, 2006.
5. Organización Mundial de la Salud. Guidelines for laboratory and field testing of long-lasting insecticidal nets. Ginebra: WHO, 2013.

Anexo

Lavado de mosquiteros de cama (MIILD)

En un recipiente de vidrio con capacidad de 1000 ml se vierten 900 ml de agua destilada y 100 ml de jabón neutro líquido.

Los recortes de los mosquiteros de cama (MIILD) se introducen individualmente en los recipientes de vidrio con la solución jabonosa.

Los vasos con los mosquiteros se agitan durante 10 minutos a 155 revoluciones por minuto en un aparato agitador.

Después de 10 minutos, las muestras de tela se retiran y enjuagan dos veces durante 10 minutos en agua destilada limpia, siempre agitando y en las mismas condiciones indicadas anteriormente cada vez.

Se retiran los recortes de los mosquiteros de cama y se dejan secar a temperatura ambiente y se almacenarán en un ambiente oscuro y seco durante 24 horas.

Posteriormente a las 24 horas de secado se repite el lavado hasta completar 5, 10, 15 y 20 lavadas.



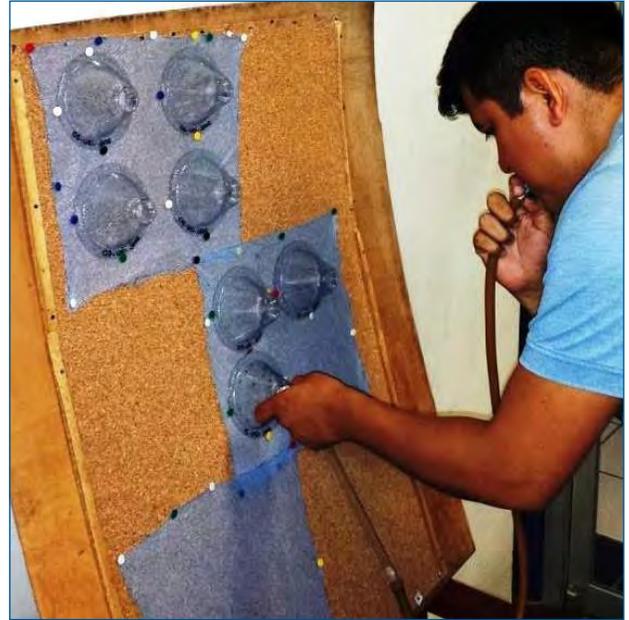
Foto 025 Lavado de muestras de mosquiteros de cama en un aparato agitador.

Anexo fotográfico

Fotografías: José Genaro Ordóñez González.



Colocación de recortes de tela y material biológico.



Material biológico



Foto 007 Material biológico.



Foto 024 Vasos de reposo y conservación de mosquitos para lectura de mortalidades.



Foto 011 Área de reposo y observación de mosquitos, para lectura de mortalidad a 24 horas post-exposición: mosquitos expuestos y mosquitos control.

Anexo

Formato de captura de datos

PRUEBAS DE CONTACTO/PARED
para adulticidas incorporados en mosquiteros de cama (MIILD)

Fecha:	Hora:	Núm. de lavadas:
Tiempo de exposición:		Dosis i.a./m ² :
Nombre comercial del MIILD:		Ingrediente activo:
Temperatura:		Humedad Relativa:
Insecto:		Hembras por cono:

RESULTADOS DE MOSQUITOS EXPUESTOS

Número de muestra	Núm. Cono	Núm. de mosquitos expuestos	Núm. mosquitos caídos a 30 min. post exposición	Núm. mosquitos muertos a 12 h post exposición	% mosquitos muertos a 24 h post exposición
Muestra Tela 1	1				
	2				
	3				
	4				
Muestra Tela 2	1				
	2				
	3				
	4				
Muestra Tela 3	1				
	2				
	3				
	4				
Muestra Tela 4	1				
	2				
	3				
	4				

RESULTADOS MOSQUITOS CONTROL

Número de muestra	Núm. Cono	Núm. de mosquitos expuestos	Núm. mosquitos caídos a 30 min. post exposición	Núm. mosquitos muertos a 12 h post exposición	% mosquitos muertos a 24 h post exposición
Muestra Control	1				
	2				
	3				
	4				

Prueba de eficacia biológica de larvicidas

MORTALIDAD AGUDA. EFECTO RESIDUAL/INHIBICIÓN DE LA EMERGENCIA

Introducción

La aplicación de larvicidas para el control de vectores ocupa un lugar preponderante en las acciones emprendidas por los programas de control. Su eficacia y efectividad no depende únicamente de la susceptibilidad de la especie a controlar, de la acción larvicida del producto y de su residualidad. También existen factores intrínsecos del producto, como la formulación, que también podrían incidir en la eficacia del producto, así como la calidad del agua, ubicación y tipo de criaderos.

Es recomendable que, antes de elegir un larvicida como herramienta para el control de vectores de enfermedades, se evalúe su eficacia biológica, efectividad y residualidad. Existen tres clases de larvicidas: químicos, biológicos y misceláneos, los cuales de acuerdo a su naturaleza generan una respuesta de diferente intensidad en las larvas de mosquitos. En general, los larvicidas químicos causan efectos sobre el sistema nervioso de las larvas, ocasionando mortalidad aguda (es decir mortalidad en larvas a las 24 horas de exposición) y mortalidad residual (es tiempo prolongado de acción larvicida). Por su parte, los larvicidas biológicos y misceláneos presentan un efecto sobre el desarrollo de las larvas (ciclo biológico) y se mide el nivel de inhibición de la emergencia y la residualidad del producto.

Para elegir un larvicida, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda una serie de pruebas, entre las que destacan los bioensayos para determinar la eficacia y el efecto residual.

En este documento proponemos protocolos para realizar bioensayos a nivel de semi-campo para la determinación del efecto residual basado en una revisión de bibliografía actualizada, protocolos de la OMS y experiencias prácticas obtenidas de los trabajos realizados sobre este tema.

Objetivo

Determinar la eficacia biológica: mortalidad aguda/el efecto residual/inhibición de la emergencia producida por productos larvicidas de diferentes tipos de formulaciones, sobre estadios inmaduros de vectores de ETV's; por ejemplo, de los géneros *Anopheles* spp. y *Aedes* spp.

Materiales y métodos

Tipo de prueba: Pruebas de eficacia biológica con larvicidas: mortalidad aguda/efecto residual/inhibición de la emergencia.

Lugar del estudio

Las evaluaciones se realizan en condiciones confinadas en un área experimental a nivel de semi-campo, y a nivel de campo, dependiendo de los objetivos del estudio (ver anexo fotográfico).

Coordenadas

Las coordenadas latitud, longitud y metros sobre nivel del mar deben ser registradas mediante un Sistema de Posicionamiento Global (GPS por sus siglas en inglés).

Periodo del estudio

El periodo de estudio depende de la naturaleza del larvicida: para larvicidas convencionales el periodo de estudio será de 9 semanas (63 días) (ejemplo, temefos) y para larvicidas misceláneos (ejemplo, reguladores de crecimiento) el estudio dura 5 semanas (35 días). Los periodos de estudios están determinados por los criterios de autoridades de salud de cada país.

Material biológico

Las larvas de mosquitos a utilizarse dependen del objetivo del estudio; por ejemplo, pueden provenir de cepas locales, cepas caracterizadas como resistentes o susceptible. Independientemente de la cepa, las larvas serán criadas a partir de mosquitos colonizados y criados en un insectario. Los estudios se realizan con larvas de mosquitos correspondientes a la generación F_1 de la cepa especificada, homogéneamente de la misma edad (preferiblemente de tercer estadio).

Insecticidas

Los productos larvicidas a evaluarse deben venir acompañados de la siguiente información:

- Nombre comercial del producto
- Nombre del ingrediente activo
- Formulación
- Porcentaje de ingrediente activo (%)
- Solvente (si lo requiere)
- Número de lote
- Fecha de elaboración
- Fecha de caducidad
- Indicaciones para preparación de la mezcla (si lo requiere)
 - Dosis de aplicación
 - Aplicación

Recipientes centinelas

Las jaulas centinelas son recipientes plásticos de 500 ml de capacidad que consta de una base permeable al agua (tela/malla fina) y un flotador que permite que el recipiente permanezca al nivel de la superficie del agua de los con-

tenedores (ver foto en anexos). Los recipientes centinelas son utilizados en estudios en los que se emplean recipientes profundos, en los cuales no se pueden recuperar los cuerpos de las larvas muertas para contarlas ni medir la mortalidad (como por ejemplo tambos de 200 litros, tanques domiciliarios, etc).

Contenedores para pruebas

Se utilizan contenedores de 200 litros (tambos) los cuales son de plástico y cuentan con una llave de paso en la base para retirar el agua. También se utilizan recipientes de 40 litros, de plástico transparente, y bandejas de peltre de color blanco de 4 litros de capacidad (ver anexo fotográfico).

Aplicación del producto

La aplicación del producto depende de su naturaleza (químico sintético, biológico) y de su formulación:

Larvicidas granulados/pellets

Se pesa la cantidad del producto de acuerdo a las indicaciones de la etiqueta, en una balanza granataria, el producto puede ser colocado dentro de una bolsita plástica; posteriormente, con la ayuda de un clip se realizan agujeros a la bolsa y se introduce en los recipientes de 200 litros (tambos) de capacidad (similar al que la población utiliza para almacenar agua en sus viviendas); o también pueden ser agregados directamente en el agua. Esto va a depender de las instrucciones de su uso y aplicación dadas por el fabricante en la etiqueta que lo acompaña.

Larvicidas líquidos

Con la ayuda de una micropipeta se extrae del envase del producto la cantidad requerida y se vierte directamente en recipientes con capacidad de 200 l de agua (similar al que la población utiliza para almacenar agua en sus viviendas); también puede ser aplicado en contenedores de 40 l de capacidad.

Larvicidas misceláneos líquidos

Con la ayuda de una micropipeta se extrae del envase del producto la cantidad requerida y se vierte directamente en recipientes con capacidad de 40 l de agua.

Larvicidas en polvo

Se pesan en una balanza granataria y se aplica directamente en el agua. Para este tipo de larvicidas se utilizan las bandejas de peltre de 5 litros.

Larvicidas en tabletas.

Éstos se aplican directamente en el agua, ya sea en tambos, tanques, tinas de 40 litros o en bandejas de peltre.

Protección personal

El manejo y aplicación de los larvicidas requiere del uso de una bata de laboratorio, guantes de látex y cubrebocas.

Método de evaluación

La evaluación de la mortalidad aguda/el efecto residual larvícida/inhibición de la emergencia se realiza siguiendo las recomendaciones de la Guía para determinar la susceptibilidad y/o resistencia de mosquitos a insecticidas (CEN-APRECE), y las de WHOPES (WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13).

Larvicidas granulados/pellets

1. Agregar 200 litros de agua del suministro domiciliario de agua potable a seis recipientes (tambos).
2. Aplicar el larvícida (ver sección de aplicación del producto) en cuatro recipientes de tratamiento, y los dos recipientes restantes funcionan como controles sin aplicación del producto.
3. Introducir cuatro vasos centinelas en cada uno de los seis recipientes de 200 litros (tratamiento y controles).
4. Agregar grupos de 20-25 larvas de tercer estadio de la especie de mosquito a controlar dentro de cada vaso centinela.
5. Tapar con tela tul los vasos centinelas y a continuación tapar todos los recipientes/contenedores de agua, para garantizar la protección de las larvas y evitar posibles oviposiciones de hembras de mosquitos del ambiente o en caso de emergencia, evitar que los adultos escapen.
6. Agregar alimento a las larvas cada 24 horas.
7. Cada 24 horas durante 20 minutos los recipientes son tratados con oxigenadores de agua utilizados para pe-

ceras, para simular el movimiento del agua en los recipientes/contenedores que existen en las casas habitadas.

8. Cada 3 semanas se abre la llave para vaciar la mitad del agua de cada recipiente/contenedor, y volver a llenar con agua nueva hasta lograr la cantidad original (200 l).

9. Cada 24 horas en cada recipiente se realizan las siguientes actividades: Lectura de mortalidad de larvas o pupas, número de adultos emergidos, y retirar las larvas muertas.

10. La residualidad del producto se monitorea, durante nueve semanas. Cada siete días se retira el material biológico vivo y muerto, y se introducen nuevos grupos de larvas de tercer estadio y se realizan las actividades desde el punto 5.

Larvicidas misceláneos (líquidos).

1. Agregar 40 litros de agua del suministro domiciliario de agua potable a seis recipientes (tinas de 40 litros).
2. Aplicar el larvícida (ver 4. Aplicación del producto) en cuatro recipientes de tratamiento, y los dos recipientes restantes funcionan como controles sin aplicación del producto.
3. Introducir cuatro vasos centinelas en cada uno de los seis recipientes de 40 litros (4 tratamientos y 2 controles).
4. Agregar grupos de 20-25 larvas de tercer estadio de la especie de mosquito a controlar dentro de cada vaso centinela.
5. Tapar con tela tul los vasos centinelas y a continuación tapar todos los recipientes/contenedores de agua, para garantizar la protección de las larvas y evitar posibles oviposiciones de hembras de mosquitos del ambiente o, en caso de emergencia, evitar que los adultos escapen.
6. Proveer alimento a las larvas cada 24 horas.
7. Cada 24 horas, en cada recipiente se realizan las siguientes actividades: Lectura de mortalidad de larvas o pupas, número de adultos emergidos y retirar las larvas muertas.
8. La residualidad del producto se monitorea durante nueve semanas. Cada siete días se retira el material biológico vivo y muerto; además se introducen nuevos grupos de larvas de tercer estadio y se realizan las actividades desde el punto 7.

Larvicidas convencionales.

Temefos 1% granulado

1. Agregar 200 litros de agua del suministro domiciliario de agua potable a seis recipientes (tambos) con capacidad de 200 litros.

2. Pesar la cantidad del producto de acuerdo a lo requerido por el fabricante en una balanza granataria.

3. Colocar el producto dentro de una bolsita plástica y con una cuerda amarrar la bolsita para evitar el derrame del producto.

4. Introducir una bolsita con el producto en cuatro recipientes con agua (1 bolsita por cada recipiente) y sujetar la cuerda a la orilla del recipiente para evitar que la bolsita se vaya hacia el fondo, en lo posible procurar que quede suspendida a unos 10cm del fondo.

5. Con la ayuda de un clip se realizan agujeros a las bolsitas para la liberación del larvicida hacia el agua.

6. Dos recipientes no serán tratados con el producto larvicida, para que funcionen como controles.

7. Introducir cuatro vasos centinelas en cada uno de los seis recipientes de 200 litros (tratados y controles).

8. Agregar grupos de 20-25 larvas de tercer estadio de la especie de mosquito a controlar en cada vaso centinela.

9. Tapar con tela tul los vasos centinelas y luego a todos los recipientes (tambos) para garantizar la protección de las larvas y evitar posibles oviposiciones de hembras de mosquitos del ambiente o, en caso de emergencia, evitar que los adultos escapen.

10. Proveer alimento a las larvas cada 24 horas.

11. Cada 24 horas durante 20 minutos los recipientes son tratados con oxigenadores de agua usados para peceras, para simular el movimiento del agua en los recipientes en casas habitadas.

12. Durante las nueve semanas del estudio, realizar tres recambios de agua, para lo cual se abre la llave para vaciar la mitad del agua de cada recipiente; después se vuelve a llenar con agua nueva hasta lograr la cantidad original (200 l).

13. Cada 24 horas en cada recipiente se realizan las siguientes actividades: lectura de mortalidad de larvas o pupas, número de adultos emergidos y retirar las larvas muertas.

14. Para monitorear la residualidad del producto, durante nueve semanas, cada siete días se retiran las larvas sobrantes de la semana anterior y se introducen nuevos grupos de larvas de tercer estadio y se realizan las actividades desde el punto 9.

Temefos 500 concentrado emulsionable

1. Agregar 200 litros de agua del suministro domiciliario de agua potable a seis recipientes (tambos) con capacidad de 200 litros.

2. Con una micropipeta medir la cantidad de larvicida a aplicar; de acuerdo a lo requerido por el fabricante.

3. Verter el producto directamente en un recipiente de 200 litros de agua, tratar un total de cuatro recipientes.

4. Dos recipientes no serán tratados con el producto larvicida para que actúen como controles.

5. Introducir cuatro vasos centinelas en cada uno de los seis recipientes de 200 litros (tratados y controles).

6. Agregar grupos de 20-25 larvas de tercer estadio de la especie de mosquito a controlar en cada vaso centinela.

7. Tapar con tela tul los vasos centinelas y posteriormente a todos recipientes/tambos para garantizar la protección de las larvas y evitar posibles oviposiciones de hembras de mosquitos del ambiente o, en caso de emergencia, evitar que los adultos escapen.

8. Cada 24 horas, durante 20 minutos, los recipientes son tratados con oxigenadores de agua usados para peceras, para simular el movimiento del agua en los recipientes (tambos) en casas habitadas.

9. Cada 24 horas en cada recipiente se realizan las siguientes actividades: lectura de mortalidad de larvas o pupas, número de adultos emergidos, retirar las larvas muertas.

10. Proveer alimento a las larvas cada 24 horas.

11. Para monitorear la residualidad del producto, durante nueve semanas, cada siete días se retiran las larvas sobrantes de la semana anterior, y se introducen nuevos grupos de larvas de tercer estadio, y se repite el proceso desde el paso 7.

Larvicidas misceláneos

Reguladores de crecimiento granulados

1. Agregar 200 litros de agua del suministro (potable) a seis recipientes con capacidad de 200 litros.

2. Pesar la cantidad del producto de acuerdo a lo requerido por el fabricante en una balanza granataria.

3. Colocar el producto dentro de una bolsa plástica (8x26cm) y con una cuerda amarrar la bolsa para evitar la fuga del producto.

4. Introducir una bolsa con el producto en cuatro recipientes con agua (1 bolsa por recipiente) y sujetar la cuerda a la orilla del recipiente para evitar que la bolsa se vaya hacia el fondo.

5. Dos recipientes no serán tratados con el producto larvicida, para que funcionen como controles.

6. Con la ayuda de un clip se realizan agujeros a la bolsa para la liberación del larvicida en el agua.

7. Introducir cuatro vasos centinelas en cada uno de los seis recipientes de 200 litros (tratados y controles).

8. Adicionar grupos de 20-25 larvas de tercer estadio de la especie de mosquito a controlar en cada vaso centinela.

9. Tapar con tela tul los vasos centinelas y a todos recipientes para garantizar la protección de las larvas y evitar posibles oviposiciones de hembras de mosquitos del ambiente o, en caso de emergencia, evitar que los adultos escapen.

10. Proveer alimento a las larvas cada 24 horas.

11. Cada 24 horas, durante 20 minutos, los recipientes son tratados con oxigenadores de agua para peceras, para simular el movimiento al que son expuestos los recipientes en casas habitadas.

12. Cada 24 horas en cada recipiente se realizan las siguientes actividades: lecturas de mortalidad de larvas o pupas, número de adultos emergidos y retirar las larvas muertas.

13. Para monitorear la residualidad del producto, cada siete días, durante nueve semanas, se introduce nuevos grupos de larvas de tercer estadio y se retiran las larvas sobrantes de la semana anterior.

Reguladores de crecimiento concentrado emulsionable

1. Agregar 200 litros de agua del suministro domiciliario de agua potable a seis recipientes con capacidad de 200 litros.

2. Con una micropipeta medir la cantidad de larvicida a aplicar, de acuerdo a lo requerido por el fabricante.

3. Verter el producto directamente en un recipiente de 200 litros de agua, tratar un total de cuatro recipientes.

4. Dos recipientes no serán tratados con el producto larvicida para que actúen como controles.

5. Introducir cuatro vasos centinelas en cada uno de los seis recipientes de 200 litros (tratados y controles).

6. Adicionar grupos de 20-25 larvas de tercer estadio de la especie de mosquito a controlar en cada vaso centinela.

7. Tapar con tela tul los vasos centinelas y a todos recipientes para garantizar la protección de las larvas y evitar posibles oviposiciones de hembras de mosquitos del ambiente o, en caso de emergencia, evitar que los adultos escapen.

8. Cada 24 horas, durante 20 minutos, los recipientes son tratados con oxigenadores de agua para peceras para simular el movimiento al que son expuestos los recipientes en casas habitadas.

9. Cada 24 horas en cada recipiente se realizan las siguientes actividades: lecturas de mortalidad de larvas o pupas, número de adultos emergidos, retirar las larvas muertas, proveer alimento a las larvas cada 24 horas.

10. Para monitorear la residualidad del producto durante nueve semanas, cada siete días se retiran las larvas sobrantes de la semana anterior, y se introduce nuevos grupos de larvas de tercer estadio, y se realiza el procedimiento desde el paso 7.

Películas monomoleculares

1. Agregar 40 litros de agua del suministro domiciliario de agua potable a seis recipientes (tinas plásticas de color blanco) o 4 litros de agua en seis recipientes de peltre (charolas metálicas de color blanco).

2. Con una micropipeta medir la cantidad del líquido (película monomolecular) a aplicar, de acuerdo a lo requerido por el fabricante.

3. Verter el producto directamente en los recipientes de agua, tratar un total de cuatro recipientes. Dos recipientes no serán tratados con el producto para que actúen como controles.

4. Agregar grupos de 20-25 larvas de tercer estadio de la especie de mosquito a controlar en cada recipiente.

5. Tapar con tela tul todos recipientes para garantizar la protección de las larvas y evitar posibles oviposiciones de hembras de mosquitos del ambiente o, en caso de emergencia, evitar que los adultos escapen.

6. Cada 24 horas en cada recipiente se realizan las siguientes actividades: lectura de mortalidad de larvas o pupas, número de adultos emergidos, retirar las larvas muertas, proveer alimento a las larvas cada 24 horas.

7. Para monitorear la residualidad del producto durante nueve semanas, cada siete días se retiran las larvas sobrantes de la semana anterior y se introduce nuevos grupos de larvas de tercer estadio, y se repite el procedimiento desde el punto 5.

VARIABLES AMBIENTALES

Durante cada prueba se registrarán las condiciones ambientales presentes: temperatura (°C), humedad relativa tanto al inicio como al final de la misma (ver anexo fotográfico).

CAPTURA DE DATOS

Los resultados de Mortalidad aguda/Efecto residual/inhibición de la emergencia se anotarán en los formatos de pruebas con larvicidas (ver formato en anexo).

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para el análisis de los resultados de las pruebas (para una especie, un larvicida y una dosis) se emplea un análisis de la varianza de una vía.

MATERIALES UTILIZADOS EN LAS PRUEBAS

- Tambos de 200 l.
- Tinas plásticas de 40 l.
- Bandejas de peltre de 4 l.
- Goteros.

Para construir trampas centinelas (unidad de muestreo) se necesita:

- Recipientes de plástico 500 ml.
- Tela tul malla fina.
- Resistol.
- Unicel.
- Cuter.
- Termo higrómetro.
- Lápiz.
- Formatos para captura de datos.
- Tablas de campo.
- Lupas.

REFERENCIAS

1. Abbott WS. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol.* 1925;18:265-267.
2. Montgomery DC. *Design and Analysis of Experiments*, Minitab Manual. 7th Edition. Arizona: John Wiley & Sons, 2010.
3. Mulla MS, Thavara U, Tawatsn A, Chompoonsri J. Procedures for the evaluation of field efficacy of slowrelease formulations of against *Aedes aegypti* in water-storage containers. *J Am Mosq Control Assoc.* 2004; 20:64-73.
4. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores. México: Diario Oficial de la Federación, 2015.
5. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector. México: Diario Oficial de la Federación, 2011.
6. Secretaría de Salud. Guía Metodológica Para Acciones de Control Larvario. México: SS, CENAPRECE, 2016.
7. Secretaría de Salud. Guía para determinar la susceptibilidad y/o resistencia de mosquitos a insecticidas. México: SS, CENAPRECE, 2010.
8. Thavara U, Tawatsin A, Kong-Ngamsuk W, Mulla MS. Efficacy and longevity of a new formulation of temephos larvicide tested in village-scale trials against larval *Aedes aegypti* in water storage containers. *J Am Mosq Control Assoc.* 2004;20:176-82.
9. Thavara U, Tawatsin A, Srithommarat R, Zaim M, Mulla MS. Sequential release and residual activity off Temephos applied as sand granules to water-storage jars for the control of *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology.* 2005;3 (1):62-72.
10. Organización Mundial de la Salud. Operational manual on the application of insecticides for control of the mosquito vectors of malaria and other diseases. Ginebra: OMS, 2001.
11. Organización Mundial de la Salud. Report of the WHO informal consultation on the "Evaluation and testing of insecticides". Ginebra: OMS, 1996.
12. Organización Mundial de la Salud. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Ginebra: OMS, 2005.
13. Organización Mundial de la Salud. Temephos Technical. Ginebra: OMS, 1999.
14. Zar JH. *Biostatistical Analysis*. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1984.

Anexo fotográfico

Fotografías: José Genaro Ordóñez González.



Foto 027-1 Tambos y tinas de plástico con capacidad de 200L y 40L respectivamente.

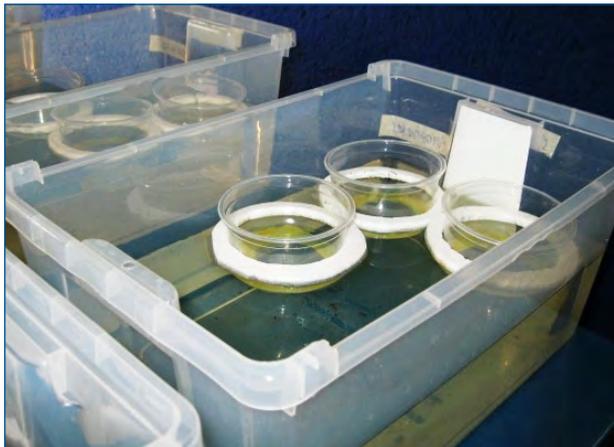


Foto 027-2 Vasos centinelas para siembra de larvas.



Foto 027-3 Aplicación de larvicida usando una micropipeta.



Foto 028-1 Siembra de larvas para pruebas.



Foto 028-2 Revisión de larvas vivas, muertas y pupas.

Material biológico



Foto 028-3 Huevos y larvas.

Anexo

Formato de captura de datos

Pruebas de eficacia biológica de larvicidas: MORTALIDAD AGUDA. EFECTO RESIDUAL/ INHIBICIÓN DE LA EMERGENCIA

Fecha:	Hora:	Hora/Día/Semana post tratamiento:
Nombre comercial:		Ingrediente activo:
Dosis:		Mezcla:
Insecto:		Núm. de larvas por vaso centinela de exposición
Temperatura:		Humedad Relativa:

RESULTADOS DE MOSQUITOS EXPUESTOS

Núm. recipiente	Número de larvas expuestas	Núm. Larvas vivas	Núm. Larvas muertas	Núm. pupas	Núm. Adultos emergidos
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

RESULTADOS MOSQUITOS CONTROL

Núm. recipiente	Número de larvas expuestas	Núm. de larvas muertas	Núm. Pupas	Núm. Adultos emergidos
1				
2				
3				
4				

Observaciones:

Apéndice I

Calibración de la tasa de descarga de la máquina pesada

Generalmente, la Tasa de descarga se mide en ml/min, y corresponde a la cantidad de mezcla que la máquina pesada libera al espacio en forma de una nube fría a ULV durante su recorrido. La calibración de la tasa de descarga se realiza previamente a la calibración del tamaño de gota.

La tasa de descarga se determina midiendo la descarga del líquido en mililitros por minuto en un vaso o probeta graduada.

Si queremos descargar una determinada cantidad de mezcla (ml/min), debemos calibrar la bomba de succión de tal manera que nos dé el valor requerido.

Procedimiento de calibración:

1. Afloje los dos tornillos que aseguran la tapa de la bomba de succión del insecticida y levante la tapa.
2. En el interior observará el puntero de la bomba del insecticida (de color azul), y lo puede aflojar haciendo girar los dos discos estriados que se encuentran uno a cada lado.
3. Si desea modificar la tasa de descarga, mueva el puntero hacia arriba o abajo, a un nuevo valor de la escala, girando el tornillo regulador de insecticida hacia la izquierda o derecha.
4. La medición de la tasa de descarga se realiza con el motor apagado. La bomba de succión del insecticida trabaja con corriente de la batería, independiente del motor.
5. Retire el extremo de la manguera que lleva el insecticida hasta la cabeza de descarga conectada a la boquilla, y colóquela en un recipiente limpio para que reciba el insecticida.

6. Mueva el interruptor OVERRIDE que se encuentra en el interior de la caja gris de la bomba del insecticida a la posición ON. El interruptor OVERRIDE debe encontrarse en todo momento desconectado. Solo se le conecta en el momento de calibrar la descarga. La bomba de succión del insecticida funciona directamente con la corriente de la batería.

7. Cuando la salida del líquido sea uniforme sin espuma ni burbujas, pase rápidamente la manguera a una probeta graduada y deje caer el líquido durante un minuto.

8. Con la ayuda de un asistente tome el tiempo (60 segundos) utilizando un reloj digital.

9. Mida la cantidad de insecticida descargado en la probeta. Si no se obtiene la tasa de descarga deseada, utilizando la perilla negra mueva el puntero azul a un valor superior o inferior, según el resultado que obtuvo anteriormente, y vuelva a medir la descarga con la probeta graduada.

10. Una vez obtenido el valor deseado, desconecte el interruptor "OVERRIDE" llevándolo a la posición OFF, ajuste el puntero azul apretando los discos estriados y cierre la caja gris de la bomba del insecticida.

11. Vuelva a colocar la manguera del insecticida en la cabeza de descarga

12. Vacíe el insecticida del recipiente y la probeta al tanque del insecticida.

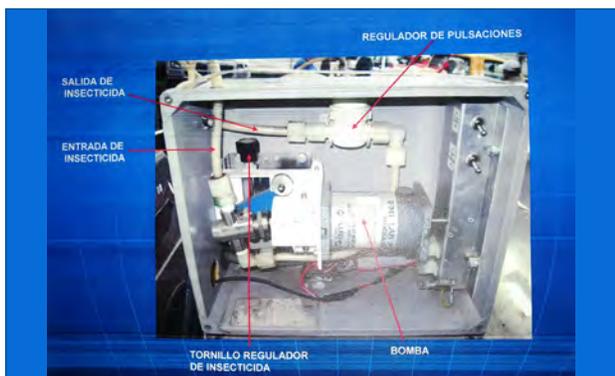


Foto 029-1 Bomba de succión.



Foto 029-2 Sistema de descarga de insecticida.



Foto 030-1 Preparación de la máquina pesada para calibración de la tasa de descarga.



Foto 030-2 Encendido de la bomba de succión y descarga de la mezcla por 1 minuto.

Calibración del tamaño de gota de la máquina pesada

Para realizar la calibración del tamaño de gota, se debe contar con un equipo DC-III o un equipo DC-IV, una computadora portátil con sistemas operativos Windows - Microsoft Windows 2000, XP, VISTA, Puerto USB 2.0., en la cual se instala el software de medición de tamaño de gota. A continuación:

1. Conecte un extremo del cable USB al puerto USB de la computadora y el otro extremo al conector mini USB en el DC-IV. Asegúrese de que todas las conexiones de tornillo están ajustadas.
2. Conecte el cable de energía eléctrica a la fuente de alimentación del DC-IV y el otro extremo del cable de energía eléctrica a la fuente de alimentación (110 VAC, 220 VAC o 12 VDC).
3. Conecte el cable de la sonda de medición de gotas al DC-IV.
4. Conecte la sonda al cable de la sonda de medición de gotas.
5. Registrar los datos solicitados por el programa de medición del tamaño de gota.
6. Es importante seleccionar la opción de medición del tamaño de gota para insecticidas con mezclas base agua o mezclas base aceite.
7. Registrar las condiciones ambientales: velocidad del viento, temperatura y humedad relativa, utilizando un anemómetro y un termo-higrómetro al inicio de la medición del tamaño de gota.
8. Encienda la máquina pesada y aplique la nube del insecticida espacialmente a ULV en un espacio abierto
9. Un asistente sostiene la sonda (vástago) de medición de gotas a una distancia de 3 metros aproximadamente respecto a la boquilla de salida de la mezcla de insecticida de la máquina pesada
10. El asistente colecta las gotas con la sonda (vástago) de medición de gotas, para ello introduce la sonda (vástago) en el interior de la nube emitida por la máquina pesada durante 30 segundos.
11. El programa DC-IV arrojará automáticamente el tamaño promedio de las gotas generadas por la máquina pesada.
12. Repetir el proceso tres veces y sacar un promedio del tamaño de gota.

13. Antes de cada medición se debe limpiar el vástago introduciéndolo en acetona y luego en xileno, y esperar que seque unos segundos.

14. Si se desea un tamaño de gota en específico, calibre la aceleración del motor de la bomba de la máquina pesada aumentando o disminuyendo el número de revoluciones por minuto (rpm). A mayor rpm se reduce el tamaño de la gota, y viceversa.



Foto 002 Equipo DC-IV (KLDLABS Incorporated) para calibrar el tamaño de gota.



Foto 003 Anemómetro y termohigrómetro.

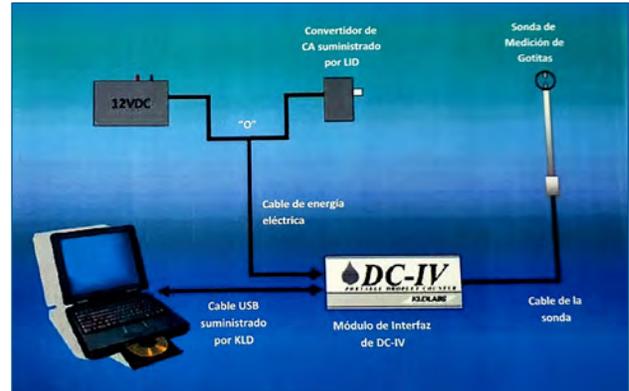


Foto 031 Descripción esquemática de la conexión del equipo DC-III o DC-IV a la computadora y el vástago para la medición del tamaño de gota. Fuente: DC-IV (KDLABS Incorporated).

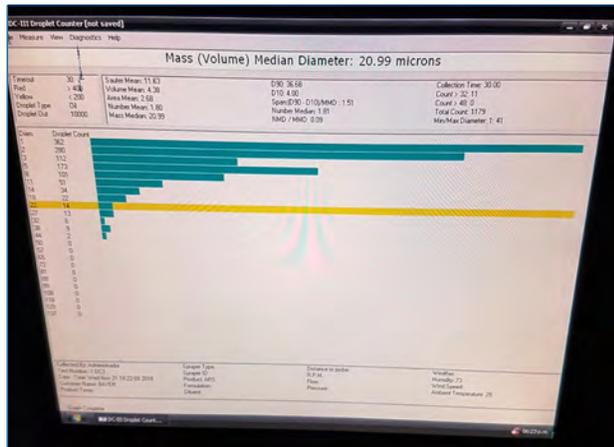


Foto 032-3 Resultado de la medición del tamaño de gota



Foto 032-1 Encendido de máquina pesada. Exposición del vástago dentro de la nube de insecticida por 30 segundos.

Apéndice II

Elaboración de jaulas para exposición de mosquitos en campo

Las jaulas deben ser elaboradas con las siguientes características: de un tamaño y volumen estándar (capacidad volumétrica de 1 litro), que brinden facilidad para la introducción y extracción de los mosquitos, que sean fáciles de colocar en los distintos sitios de exposición; deben ser prácticas para su almacenamiento, transporte, limpieza y mantenimiento.

Materiales para la elaboración de jaulas:

- Recipientes de plástico con capacidad volumétrica de 1 litro.
- Tela tul malla fina. Esta malla permite que las microgotas de insecticida penetren al interior de la jaula y al mismo tiempo evita que los mosquitos escapen.
- Pegamento.
- 40cm de cuerda/piola.
- Tijeras.
- Marcador de tinta permanente punta mediana.
- Cutter de uso rudo.
- Cinta masking tape de 5cm de ancho.

Elaboración de la jaula:

1. Utilizando un molde, se dibuja el soporte de la jaula en el bote plástico.
2. Se realiza el corte de la parte superior e inferior del recipiente, utilizando un cutter de uso rudo.
3. Se cortan los lados dejando 8 ventanas de 8 x 5cm que forman la estructura de la jaula (esqueleto).
4. Se corta tela tul malla fina del tamaño de los lados de la jaula, y se pega al esqueleto de plástico con pegamento.

5. Se toma un pedazo de 35-40cm de cuerda/piola color blanco, que se pega a los bordes laterales superiores de la jaula con el fin de formar un asa que sirve para colgarla en los sitios de prueba.

6. En la parte superior de la jaula se abre un orificio de 13mm que sirve para introducir y extraer el material biológico (mosquitos). Se corta y pega una arandela de filtro de 1cm de ancho sobre el borde del orificio, para reforzar la tela tul.

7. Se elabora una etiqueta con cinta masking tape de 5 x 5cm, que se adhiere a un extremo de la piola de la jaula. En esta etiqueta se escribe, con un marcador de tinta permanente, la información requerida: especie de mosquito expuesto, tipo de prueba, lugar, fecha, etc.

8. Las jaulas terminadas se almacenan en cajas de cartón limpias y libres de materiales contaminantes, hasta su uso en laboratorio y campo.

Etiquetado de jaulas

Las etiquetas llevan información sobre el material biológico, tipo de prueba, etc. como en el siguiente ejemplo:

- Evaluación: Pruebas lineales_Nombre del Género y especie de los mosquitos expuestos_ubicación/distancia: 10m - 20m - 30m, etc. hasta llegar a los 100m donde se colocan las jaulas con mosquitos.
- Anotar especie, tipo de cepa (susceptible o resistente). Iniciales del técnico responsable del material biológico. El número de la jaula si se duplica/triplica la actividad con dos o tres especies de mosquitos.
- Las pruebas con obstáculos, se realizan en casas habitadas. Las etiquetas llevan: el género y especie; el sitio de ubicación de las jaulas: recámara, cocina, patio; número de la casa, iniciales del técnico responsable.

Glosario

Ambiente: al conjunto de elementos naturales y artificiales o inducidos por el hombre que hacen posible la existencia y desarrollo de los seres humanos y demás organismos vivos que interactúan en un espacio y tiempo determinados.

Asperjar: a la acción de rociar un líquido en gotas de tamaño de cien a cuatrocientas micras.

Cepa resistente: a la población de mosquitos que sobreviven a una dosis de insecticida que sería letal al 100% para una población de mosquitos susceptibles

Cepa susceptible: a la población de mosquitos cuya mortalidad es del 100% cuando son sometidos a una determinada dosis de insecticida, y no alberga o alberga muy pocos individuos resistentes.

Control de vectores: a la planificación, organización, implementación y monitoreo de actividades para el manejo de poblaciones de vectores, con el objetivo de reducir o interrumpir la transmisión vectorial de las enfermedades.

Control biológico: al procedimiento que se basa en modelos ecológicos depredador-presa para la regulación y control de las poblaciones vectoriales.

Control físico: al procedimiento aplicado para disminuir o evitar el riesgo del contacto vector-humano, efectuando modificaciones en el medio ambiente para eliminar, reducir o modificar el hábitat de los transmisores en forma temporal o definitiva.

Control químico: al procedimiento aplicado contra los vectores, en sus estadios larvarios o inmaduros y de imágos o adultos, utilizando sustancias tóxicas con efecto insecticida.

Contenedores para pruebas: a los recipientes que se utilizan para aplicar los larvicidas durante los experimentos, pueden ser: contenedores plásticos o metálicos con capacidad para 200 litros de agua, tinas plásticas de 40 l, bandejas de peltre metálico de 4 l, etc.

Criadero: al lugar donde el vector hembra pone sus huevos para que se desarrollen posteriormente los estados inmaduros o juveniles, esto es, ninfas en los insectos terrestres como chinches o garrapatas y larvas y pupas en los insectos con una fase acuática en su ciclo de vida, como los mosquitos.

Dengue: a la enfermedad producida por el virus del dengue (DENV) perteneciente a la familia Flaviviridae, género Flavivirus, conformado por cuatro serotipos del DENV1 al DENV4 y que son transmitidos por la picadura de mosquitos hembras de las especies *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*.

Efectividad: a la capacidad de reducir la incidencia de casos de una ETV basado en la aplicación de un producto insecticida como una estrategia de control vectorial

Eficacia biológica: a la capacidad de un insecticida para matar a los mosquitos

Efecto Knock Down: a la parálisis muscular llamado “efecto de derribo” o “knock-down” (en inglés).

Efecto residual: a la respuesta biológica medida por la mortalidad en bioensayos específicos de la formulación, tipo de aplicación e insecto blanco, posterior a lo que puede considerarse como efecto agudo (hasta 48 horas posteriores a la aplicación).

Enfermedad de Chagas: a la enfermedad parasitaria exclusiva del Continente Americano cuyo agente etiológico es el protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi* (T. cruzi), el cual es transmitido de forma horizontal entre una persona enferma y una sana, por medio del contacto con materia fecal infectada, de chinches Redúvidos Triatomínos.

Enfermedades transmitidas por vector (ETVs): a los padecimientos en cuya cadena de transmisión interviene un vector artrópodo, como elemento necesario para la transmisión del parásito, se incluyen: dengue, chikungunya, Zika, leishmaniosis, oncocercosis, malaria, tripanosomosis y rickettsiosis.

Equipo de aspersión: a los aparatos, generalmente bombas, diseñados para rociar los insecticidas al aire o sobre una superficie.

Evaluación de eficacia y seguridad: a la prueba estandarizada con protocolos recomendados por la OMS.

Formulación de insecticida: a la mezcla de ingrediente activo adicionada por vehículo y/o coadyuvantes y/o sinergistas, que le confieren utilidad para el tipo de aplicación y eficacia biológica contra el insecto blanco.

Generación F0: a los mosquitos obtenidos a partir de huevos colectados o mosquitos adultos colectados en campo.

Generación a los mosquitos obtenidos a partir de huevos obtenidos de una Generación F0.

Hábitat: al área o espacio con todos sus componentes físicos, químicos, biológicos y sociales, en donde los seres vivos encuentran condiciones propicias para vivir y reproducirse.

Hospedero: a la persona o animal vivo que, en circunstancias naturales, permite la subsistencia o el alojamiento de un agente infeccioso o un ectoparásito.

Inhibición de la emergencia: a la capacidad de un larvicida para interrumpir el normal crecimiento y desarrollo de las larvas, inhibiendo la emergencia de adultos.

Imago: al sinónimo de adulto; insecto que presenta los órganos sexuales desarrollados.

Insecto: al artrópodo de la Superclase Hexápoda que como su nombre lo indica tiene tres pares de apéndices, su cuerpo está dividido en tres regiones bien diferenciales: cabeza, tórax y abdomen.

Insecticida: a los productos plaguicidas de origen químico, bioquímico, microbiano, botánico o misceláneo, que eliminan a los insectos vectores o evitan el contacto con el humano, que están dirigidos a cualquiera de los estadios de desarrollo (huevo, larva, pupa o imago) del vector.

Intradomiciliar: a las áreas internas de las viviendas, por ejemplo: sala, recámara, cocina, baño, etc.

Insecticidas base oleosa: a los productos insecticidas que pueden ser aplicados directamente sin mezcla, y/o en mezcla con solventes como el diésel.

Insecticidas base agua: a los productos insecticidas que se mezclan con agua para su aplicación

Insecticidas adulticidas residuales: a los productos insecticidas adulticidas con acción residual insecticida por cuatro meses o más.

Larva y pupa: a los estados juveniles o inmaduros de un insecto con desarrollo post-embionario de tipo holometábolo.

Larvicida: al producto insecticida que mata estadios inmaduros (larvas) de los insectos.

Malaria: a la enfermedad humana causada por protozoarios del género Plasmodium y que son transmitidos de un hospedero infectado a otro sano mediante picadura de hembras de mosquito del género *Anopheles*. Existen cuatro especies del parásito: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* y *P. ovale*.

Malla, pabellón: a la red protectora con determinado número de orificios por pulgada cuadrada.

Material biológico: a los mosquitos en estadios larvarios y adultos (imago) necesarios para el desarrollo de los estudios

Materiales impregnados con insecticida de larga duración (MIILD): a la malla, pabellón de cama o cortina, construida con material sintético en el que durante el proceso de fabricación se incorpora a las fibras el insecticida, con caducidad superior a los 4 años y que deben poseer efecto residual después de 20 lavadas.

Mezcla: al preparado resultado de la formulación del insecticida (en gramos o mililitros) más el diluyente (agua, diesel, aceites minerales, keroseno, etc.).

Mortalidad aguda: al cálculo de mortalidad en bioensayos con insectos o ácaros la cual se mide hasta 24 o 48 horas después de la exposición a insecticidas químicos, microbianos, misceláneos o botánicos.

Mortalidad a las 12 y 24 horas de observación: al número de mosquitos muertos de un total de ejemplares expuestos a la acción de un insecticida, después de 12 y 24 horas.

Mosquiteros de cama (MIILD): a las mallas que durante su fabricación son impregnadas con insecticida, y tienen un efecto residual prolongado, resistente a varias lavadas. También son conocidas como toldillos, pabellones, toldos.

MIILD: a los mosquiteros impregnados con insecticida de larga duración

Nebulización a ultra bajo volumen, rociado o tratamiento espacial (UBV): al procedimiento para la aplicación espacial con niebla fría de los insecticidas con equipos pesados montados en vehículos o motomochilas, a dosis muy pequeñas en grado técnico, o soluciones concentradas menores de 500 ml/ha, en formulaciones que puedan generar gotas fraccionadas cuyo diámetro óptimo debe fluctuar entre 15 y 25 micras.

Nebulización térmica: al tratamiento de un área con aerosoles calientes, tiene lugar por medio de generadores de niebla que transforman una solución de baja concentra-

ción en una nube espesa de humo que lleva suspendidas las gotas del insecticida.

Oncocercosis: a la enfermedad infecciosa, crónica, de carácter degenerativo, no mortal, causada por helminto de la familia Filariidae, *Onchocerca volvulus* y cuya consecuencia más grave es la condición denominada ceguera de los ríos.

Organofosforado: al insecticida donde el fósforo forma parte esencial de su estructura química, clasificado en el grupo de mediana toxicidad.

Películas monomoleculares: a las sustancias líquidas que aplicadas sobre la superficie del agua, forman una fina película o capa, que actúa mediante una acción físico-mecánica y no permite que las larvas y las pupas adquieran la adecuada cantidad de oxígeno atmosférico necesario para su desarrollo.

Piretroides: a los insecticidas clasificados en el grupo de baja toxicidad aguda, irritantes ligeros, de origen sintético desarrollados a partir de la investigación del piretro natural, irritantes ligeros, y cuyo modo de acción (similar al de los organoclorados) es el de afectar el transporte de iones sodio a través de la membrana del axón nervioso.

Plaguicida misceláneo: a aquel que no posee propiedades físico-químicas y toxicológicas plaguicidas, pero que presenta características que permiten el control de plagas.

Post-exposición: al tiempo que precede después de la aplicación de un producto insecticida.

Pruebas a nivel de semi-campo: en el que podemos mantener controlada la evolución de una misma población para realizar evaluaciones como mortalidad.

Pruebas a nivel de campo: las condiciones climáticas, el comportamiento de la población y otros factores, no son controlables.

Pruebas de susceptibilidad: a los ensayos estandarizados para detectar la aparición de resistencia a los insecticidas que se utilizan para el control de los insectos vectores de enfermedades.

Recipiente centinela: a los recipientes que sirven para sembrar larvas de mosquitos y que depositados en el agua con larvicida o de control, permiten leer la mortalidad de las mismas.

Regulador de crecimiento: a la sustancia que a través de un desbalance hormonal, suprime la embriogénesis, la metamorfosis y la emergencia de adultos.

Resistencia: técnicamente se define como la habilidad complementaria y hereditaria propia (capacidad adquirida) de un individuo o una población de insectos que los capacita fisiológica y etológicamente, para bloquear la ac-

ción tóxica de un insecticida por medio de mecanismos metabólicos y no metabólicos y en consecuencia, sobrevivir a la exposición de la dosis de un tóxico que sería letal para la mayoría de los individuos de una población normal de una misma especie.

Rociado espacial a ultra bajo volumen UBV (ULV): a la aplicación de nieblas de insecticidas mediante máquinas pesadas (HP) que producen micro gotas con tamaños en un rango entre 5 y 50 micras.

Rociado domiciliario: a la aplicación de un insecticida de efecto residual variable, en las superficies de las viviendas y de sus anexos.

Rociado espacial: a la aplicación de insecticida en formulación no residual a ultra bajo volumen (UBV) o ultra reducido en exteriores, en zonas habitadas o naturales inundadas, mediante aplicaciones en tierra con equipos pesados montados en vehículos, motomochilas o desde el aire en equipos montados en avionetas o helicópteros.

Rociado residual: a la aplicación de un insecticida de efecto residual variable (2-6 meses), en las superficies (paredes) de las viviendas y sus anexos, con equipo de aspersión manual que generen gotas > 100 micras y control de presión.

Solvente: a la sustancia que forma parte en mayor cantidad de una solución. La solución es compuesta por la combinación y tratamiento de un soluto (en menor cantidad, por lo general sólido o líquido pero con mayor concentración) y un solvente (líquido con propiedades propicias para que ese soluto se disuelva correctamente). El soluto universal es el agua, por su neutralidad en el proceso y su fácil adaptación a la transformación de nuevas moléculas de otros elementos.

Variables ambientales: a la temperatura y la humedad relativa.

Vector: al transportador vivo y transmisor biológico del agente causal de enfermedad. Pueden transmitir enfermedades infecciosas entre personas, o de animales a personas por picadura, mordedura, o por sus desechos.

Virus del chikungunya: al virus de la Familia *Alphaviridae* transmitido por la picadura de mosquitos de las especies *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. La sintomatología inicia con una fuerte fiebre seguida de un eritema y dolores fuertes en las articulaciones, los cuales pueden permanecer o reaparecer hasta varios meses después del inicio de la enfermedad.

Abreviaturas

CENAPRECE: Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades

COFEPRIS: Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

NOM: Norma Oficial Mexicana

OMS: Organización Mundial de la Salud (véase WHO)

OPS: Organización Panamericana de la Salud

SSA: Secretaría de Salud de México

WHO: World Health Organization (véase OMS)

WHOPES: World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme (por sus siglas en inglés)

Unidades de medida

cm: centímetros

g: gramos

g/ha: gramos por hectárea

h: horas

ha: hectáreas

l: litros

kg: kilogramos

m²: metros cuadrados

ml: mililitros

ml/ha: mililitros por hectárea

Núm.: número

UBV: ultra bajo volumen

Agradecimientos

René Monzón Vera, Hedilberto Arvizu Núñez, José Alfredo Rodas Mazariegos, Ángel Iván Ventura Fuentes, Eleazar Pérez Gómez, Joaquín Covarrubias Calderón, Miguel Ángel Guerrero Abrajan y David Alejandro Moo Llanes.

Cria de mosquitos *Culicidae*
y evaluación de insecticidas
de uso en salud pública

Se terminó de imprimir en noviembre de 2021.

La edición consta de 250 ejemplares
y estuvo al cuidado de la Subdirección
de Comunicación Científica y Publicaciones
del Instituto Nacional de Salud Pública.

