

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS**



**SUSCEPTIBILIDAD DE LARVAS DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) AL  
INSECTICIDA TEMEFÓS (ABATE) EN EL DISTRITO CENTRAL,  
FRANCISCO MORAZÁN**

**TESIS SUSTENTADA POR:  
DAVID MARTÍNEZ COLINDRES**

**PARA OPTAR AL GRADO DE MÁSTER EN ENFERMEDADES  
INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS**

**ASESOR DE TESIS:  
EDUARDO FERNÁNDEZ CERNA**

**TEGUCIGALPA M.D.C.**

**JUNIO DE 2012**

**HONDURAS C.A.**

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

RECTORA

**JULIETA CASTELLANOS, M.Sc.**

VICERRECTORA ACADÉMICA

**RUTILIA CALDERON, Ph.D.**

DIRECTORA DEL SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**OLGA MARINA JOYA, Ph.D.**

DECANA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

**MIRNA MARÍN, Ph.D.**

COORDINADORA DEL POSTGRADO EN ENFERMEDADES

INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

**MARITZA CANALES GIRON, MPH**

TEGUCIGALPA, M.D.C.

JUNIO DE 2012

HONDURAS C.A

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS  
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

ASESOR DE TESIS

**EDUARDO FERNÁNDEZ CERNA, Ph.D.**

TERNA EXAMINADORA

**EDUARDO FERNÁNDEZ CERNA, Ph.D.**

**WILFREDO SOSA, M.Sc.**

**JORGE A. SIERRA, MD, MPH.**

## AGRADECIMIENTO PARA CON EL DONANTE

Este proyecto de tesis ha sido posible gracias a una beca de estudio e investigación otorgada por el Programa Teasdale-Corti Honduras-Canadá, 2007-2012 “*Fortaleciendo Capacidades para Lograr la Meta No. 6 del Milenio en Honduras: Combatiendo las Enfermedades Infecciosas*”. Dicho proyecto opera con fondos del programa Teasdale-Corti para Alianzas para la Investigación en Salud Mundial de la agencia Canadiense **Iniciativa para la Investigación en Salud Mundial** ([www.ghri.ca](http://www.ghri.ca)).

[This thesis project has been possible thanks to a study and research scholarship granted by the Honduras-Canada Teasdale-Corti Project 2007-2012 “*Increasing Capacity to Achieve Millennium Development Goal # 6 in Honduras: Combating Infectious Diseases*”, funded by the Teasdale-Corti Global Health Research Partnership Program of the **Global Health Research Initiative** (GHRI), Canada ([www.ghri.ca](http://www.ghri.ca)).]

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Programa Teasdale-Corti Honduras-Canadá por el financiamiento de esta investigación. A la coordinación del programa de maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas de la Escuela de Microbiología de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras por encargarse de los detalles administrativos y logísticos durante el desarrollo de este estudio. A mi asesor, el Dr. Eduardo Fernández Cerna por guiarme en este proceso de aprendizaje, por su incansable dedicación al éxito de este proyecto y por su enorme paciencia al corregir los borradores del documento. Al Dr. Wilfredo Sosa por su constante apoyo y por facilitar sus contactos en la Universidad Nacional de Costa Rica. Al Dr. Víctor Cartín Leiva y al Dr. Marco Herrero de la Universidad Nacional de Costa Rica por capacitarme en lo concerniente a la cría en cautiverio de poblaciones de *Aedes aegypti* y la ejecución de bioensayos con pesticidas. Al Laboratorio de Limnología de la Escuela de Biología – UNAH por su apoyo técnico, especialmente al Lic. Gerardo Borjas por realizar la confirmación taxonómica de los especímenes en cría. A Walther Monge y Rolando Martínez por su valiosa ayuda durante las colectas de campo.

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo de investigación se lo dedico a mi padre, quién siempre me apoyó a superarme en todos los aspectos de mi vida, a mi madre por su permanente estímulo, a mis hermanos por contribuir tanto intelectual, emocional como económicamente para poder concluir este estudio, y a mis tres queridas amigas: Rafaela, Gloria y Francis Fiallos por creer en mí y darme fuerzas para continuar.

## ABREVIATURAS

**DHF:** Siglas en inglés para Fiebre hemorrágica por dengue (o dengue hemorrágico)

**DEN-1:** Serotipo tipo 1 del virus del dengue

**DEN-2:** Serotipo tipo 2 del virus del dengue

**DEN-3:** Serotipo tipo 3 del virus del dengue

**DEN-4:** Serotipo tipo 4 del virus del dengue

**WHO:** WorldHealthOrganization

**OMS:** Organización Mundial de la Salud (en inglés: WHO)

**TDR:** Siglas en inglés para Programa Especial para La Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales

**DDT:** Nombre común de un pesticida organoclorado, cuyo nombre químico (IUPAC) es 1,1,1-tricloro-2,2-bis (4-clorofenil) etano

**AVAD:** Años de vida ajustados por discapacidad (en inglés: DALY)

**DALY:** DisabilityAdjustedLifeYears, por sus siglas en ingles

**CDC:** Centers for Disease Control and Prevention (en español: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades)

**Kb:** Kilo bases. Corresponde a 1.000 pares de bases de ADN o ARN

**FR:** Factor de resistencia. Medida del nivel de resistencia a un compuesto químico encontrado en una población estudiada con respecto a una población de referencia

**FR<sub>50</sub>:** Factor de resistencia calculado sobre el 50% de una población resistente

**DL:** Dosis letal. Dosis de una sustancia o compuesto, a la cual cierta proporción de los organismos expuestos a ella produce una respuesta en un periodo definido de tiempo

**DL<sub>50</sub>:** Dosis letal de un producto químico o biológico que mata el 50% de la población

**DL<sub>90</sub>:** Dosis letal de un producto químico o biológico que mata el 90% de la población

**TABLA DE CONTENIDO**

AGRADECIMIENTO PARA CON EL DONANTE .....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
DEDICATORIA .....	iii
ABREVIATURAS.....	iv
<b>CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>4</b>
2.1 El dengue.....	4
2.1.1 Distribución del dengue y del <i>Aedes aegypti</i> .....	4
2.1.2 Población y áreas afectadas por la enfermedad .....	4
2.2 Importancia del virus del dengue .....	6
2.2.1 Formas severas del dengue .....	7
2.3 Aspectos de la infección y enfermedad del dengue .....	8
2.3.1 Manifestaciones clínicas del dengue y dengue hemorrágico.....	8
2.4 Biología del virus .....	9
2.4.1 Estructura del virus .....	9
2.5 Transmisión del virus.....	10
2.6 Vector .....	10
2.6.1 Clasificación Taxonómica .....	10
2.7 Ciclo de vida del vector.....	11
2.8 Morfología de larva y adulto.....	12
2.8.1 Características de la larva.....	12
2.8.2 Características del adulto.....	14
2.9 Ecología del vector.....	16
2.9.1 Hábitat (Sitios de ovipostura/criaderos) .....	16
2.9.2 Comportamiento de alimentación del mosquito.....	17
2.9.3 Actividad del mosquito.....	18
2.9.4 Oviposición.....	19
2.9.5 Desarrollo embrionario.....	20
2.9.6 Eclosión .....	20
2.10 Control del vector.....	20



2.10.1	Uso de controles biológicos.....	20
2.10.2	Historia del uso de insecticidas.....	21
2.10.3	Clasificación de insecticidas.....	22
2.10.4	Efectos del control químico.....	23
2.11	Ficha técnica del insecticida temefós.....	24
2.11.1	Introducción.....	24
2.11.2	Descripción del temefós.....	24
2.11.3	Usos del temefós.....	25
2.11.4	Efectos en la salud del hombre.....	26
2.12	Evaluación de la resistencia a temefós en distintas regiones del mundo.....	27
2.12.1	Hallazgos en el Sudeste de Asia.....	27
2.12.2	Hallazgos en América.....	28
2.13	Bioensayos de respuesta cuantitativa.....	30
2.14	Análisis Probit.....	31
2.14.1	Introducción.....	31
2.14.2	Establecimiento de una relación dosis-respuesta.....	31
<b>CAPITULO 3. METODOLOGÍA.....</b>		<b>34</b>
3.1	Objetivos.....	34
3.1.1	Objetivo general.....	34
3.1.2	Objetivos específicos.....	34
3.2	Hipótesis.....	34
3.3	Diseño del estudio.....	35
3.4	Periodo de estudio.....	35
3.5	Población de estudio.....	35
3.6	Selección de sitios de muestreo.....	36
3.6.1	Tipo de muestreo.....	36
3.6.2	Sitios de colecta.....	37
3.6.3	Solicitud de acceso a las viviendas.....	38
3.7	Tamaño de la muestra.....	38
3.8	Cepa de referencia.....	39
3.9	Insecticida a utilizar.....	40

3.9.1 Datos de identificación .....	40
3.9.2 Concentraciones del insecticida.....	41
3.10 Condiciones del área de trabajo.....	41
3.10.1 Monitoreo de la temperatura y la humedad relativa .....	42
3.10.2 Control del fotoperiodo.....	43
3.11 Colecta de muestras.....	43
3.11.1 Uso de ovitrampas .....	43
3.11.2 Modelo de ovitrampas .....	44
3.11.3 Colecta de larvas para prueba de estandarización .....	44
3.11.4 Clasificación de larvas y adultos en el laboratorio.....	45
3.12 Claves taxonómicas a utilizar.....	45
3.13 Acondicionamiento del insectario.....	46
3.13.1 Recipientes para la cría de larvas.....	46
3.13.2 Alimentación de las larvas.....	47
3.13.3 Alimentación de los mosquitos adultos .....	47
3.13.4 Recipientes para la puesta de huevos.....	47
3.14 Realización de bioensayos .....	48
3.14.1 Procedimiento de los bioensayos.....	48
3.14.2 Soluciones de temefós técnico en etanol absoluto.....	52
3.14.3 Fórmula para las diluciones .....	52
3.14.4 Criterio para establecer resistencia al temefós por concentración discriminante .....	54
3.14.5 Determinación de DL50 del larvicida.....	54
3.14.6 Criterio de exclusión de larvas para los bioensayos .....	55
3.14.7 Interpretación de resultados.....	55
3.15 Registro de datos .....	56
3.15.1 Bitácora de campo .....	56
3.15.2 Bitácora de laboratorio .....	56
3.16 Consideraciones éticas y de bioseguridad.....	57
3.16.1 Consideraciones éticas.....	57
3.16.2 Consideraciones de bioseguridad .....	57

3.17 Análisis estadístico.....	59
<b>CAPITULO 4. RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
4.1 Periodo de estudio .....	60
4.2 Colecta de huevos.....	60
4.2.1 Colecta de larvas y adultos de mosquitos y otros dípteros .....	61
4.3 Cría en cautiverio de dos poblaciones de <i>Aedes aegypti</i> .....	62
4.3.1 Eclosión de huevos .....	62
4.3.2 Producción de larvas, pupas y adultos.....	62
4.3.3 Condiciones de temperatura, humedad y fotoperiodo .....	63
4.4 Preparación de soluciones de temefós (Abate) .....	64
4.5 Bioensayos con temefós .....	67
4.6 Análisis Probit .....	68
<b>CAPITULO 5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>72</b>
5.1 Análisis Probit.....	72
5.2 Limitaciones y aspectos metodológicos del estudio .....	79
5.2.1 Duración y diseño del estudio.....	79
5.2.2 Muestreo de campo.....	80
5.2.3 Condiciones de temperatura y humedad.....	80
5.2.4 Ataque de hormigas y hongos.....	81
<b>CAPITULO 6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>83</b>
<b>CAPITULO 7.RECOMENDACIONES .....</b>	<b>85</b>
<b>CAPITULO 8.REFERENCIAS.....</b>	<b>88</b>

## **FIGURAS**

Figura 1. Distribución mundial del dengue en 2001 .....	5
Figura 2. Países/zonas en riesgo de transmisión del dengue.....	7
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> .....	12
Figura 4. Vista dorsal de una larva de mosquito del género <i>Aedes</i> .....	13
Figura 5. Vista dorsal de la cabeza, tórax y abdomen de una larva del género <i>Aedes</i> ...	13
Figura 6. Vista lateral del abdomen (en parte) de una larva del género <i>Aedes</i> .....	14
Figura 7. Vista dorsal de una hembra adulta de <i>Aedes aegypti</i> .....	15

Figura 8. Vista dorsal de la cabeza y tórax de un mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	15
Figura 9. Criaderos comunes de <i>Aedes aegypti</i> .....	19
Figura 10. Estructura química del temefós.....	25
Figura 11. Variación de temperatura durante el periodo de estudio .....	63
Figura 12. Variación del porcentaje de humedad relativa.....	64
Figura 13. Esquema de preparación de soluciones de temefós (Abate).....	65
Figura 13. (Cont.). Esquema de preparación de soluciones de temefós (Abate) .....	66
Figura 14. Prueba de paralelismo entre cepa Rockefeller y población de campo.....	71
Figura 15. Comparación entre DL50 población susceptible y DL50 población tolerante (Pococí, Costa Rica y Dictrito Central, Honduras respectivamente) .....	74
Figura 16. Ovitrapa modelo Estándar. ....	101
Figura 17. Jaula para la cría de mosquitos adultos de la especie <i>Aedes aegypti</i> .....	114
Figura 18. Embutido de sangre (res o cerdo) para la alimentación hematófaga de mosquitos adultos.....	115

## CUADROS

Cuadro 1. Colecta de campo (método de ovitrampas) .....	61
Cuadro 2. Datos de mortalidad y supervivencia de larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	69
Cuadro 3. Intervalos de confianza (IC), DL50 y DL90, valores de la pendiente y factor de resistencia (FR50) para una población de <i>Aedes aegypti</i> .....	70

## ANEXOS

ANEXO A. Modelo de ovitrapa utilizado para el estudio. ....	101
ANEXO B. Clave ilustrada para la clasificación de larvas de mosquitos.....	102
ANEXO C. Modelo de jaula utilizado para la cría de mosquitos adultos.....	114
ANEXO D. Uso de sangre para la alimentación hematófaga de mosquitos adultos ...	115
ANEXO E. POE para la colecta de campo de huevos de <i>Aedes aegypti</i> . ....	116
ANEXO F. POE para la cría en cautiverio de <i>Aedes aegypti</i> .....	121
ANEXO G. POE para la elaboración de soluciones de temefós (Abate).....	135

## CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad viral aguda que afecta al ser humano, es de amplia distribución geográfica, y produce fiebre, dolor de cabeza, dolor en músculos y articulaciones, rash cutáneo o sarpullido, náuseas y vómitos. Algunas infecciones pueden evolucionar en una forma más severa de la enfermedad, conocida como fiebre hemorrágica por dengue (DHF) o dengue hemorrágico, un síndrome que puede amenazar la vida de las personas al provocar hemorragias y shock [Rigau-Pérez et al., 1998]. A nivel mundial, el dengue es considerada la enfermedad viral transmitida por artrópodos más importante y de mayor incidencia [del Ángel, 2006].

Se conocen cuatro variedades o serotipos del virus del dengue, denominados: DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4, cada uno de los cuales puede producir la enfermedad [The Wellcome Trust, 2005]. El virus se transmite de persona a persona por la picadura del mosquito *Aedes aegypti*, quién en los últimos 80 años se ha identificado como el principal vector [Seccacini et al., 2008]. Actualmente, el mosquito *Aedes aegypti* ha colonizado nuevos territorios, llegando a países en donde antes no se reportaba, aumentando así su distribución geográfica y posicionando al dengue como la enfermedad transmitida por mosquitos de más rápida dispersión a nivel mundial, reportando 50 millones de casos al año aproximadamente [WHO/TDR, 2009].

No existe aún una vacuna contra el virus del dengue, por lo que la prevención y control de la enfermedad se centran en el control del mosquito vector [Troyo et al., 2006]. El uso de insecticidas para eliminar tanto los estados inmaduros (larvas, pupas) como los mosquitos adultos, ha sido el método más utilizado en todo el mundo, sin embargo, su eficacia se ha

visto disminuida en los últimos 30 años debido al desarrollo de mecanismos de resistencia a estos químicos en poblaciones del mosquito [Gubler, 1998; Rodríguez et al., 2007].

La aparición de individuos resistentes a los insecticidas más utilizados como el organofosforado temefós, o el piretroide deltametrina, se ha determinado gracias a la realización de ensayos o pruebas de laboratorio y de campo, en donde se expone a larvas y/o adultos a diferentes concentraciones de uno o varios insecticidas [Rodríguez et al., 2007]. Los resultados de estos ensayos han demostrado una creciente tendencia por parte del vector a desarrollar resistencia a una amplia gama de insecticidas, evidenciando la necesidad de realizar pruebas sistemáticas para monitorear los niveles de susceptibilidad del mosquito en los programas de vigilancia entomológica [Bisset et al., 2009; Rodriguez et al., 2002].

En Honduras, la lucha contra el mosquito transmisor del dengue se lleva a cabo casi exclusivamente mediante el uso de insecticidas, particularmente temefós (más conocido como Abate) para la eliminación de larvas durante el tratamiento focal en recipientes que almacenan agua, y deltametrina como adulticida en los programas de rociado peridomiciliario. En años recientes sin embargo, los casos de dengue se han ido incrementando y la infestación de mosquitos parece no disminuir a pesar del uso continuado de insecticidas, lo que podría indicar la aparición de resistencia a estos productos [Bisset et al., 2009; Silva et al., 2008]. Debido a lo anterior, el presente estudio aporta datos sobre el nivel de susceptibilidad al insecticida organofosforado temefós, en muestras de *Aedes aegypti* colectadas en tres colonias del Distrito Central, Departamento de Francisco Morazán, para contribuir con las autoridades de Salud del país en la toma de

decisiones sobre las estrategias a seguir en el futuro para lograr un mejor control del dengue, proveyendo evidencia científica sobre la efectividad de dicho insecticida.

Este estudio se llevó a cabo mediante la ejecución de bioensayos en laboratorio siguiendo los procedimientos establecidos en el protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas de mosquitos de la especie *Aedes aegypti*, de la Red Latinoamericana de Control de Vectores [Bisset et al., 2005]. El objetivo general del estudio fue: evaluar la susceptibilidad al insecticida temefós (Abate) en larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) colectadas en el Distrito Central, Francisco Morazán. Los objetivos específicos fueron: determinar el grado de susceptibilidad al larvicida temefós (Abate) de larvas de *Aedes aegypti* colectadas en las colonias Manchén, Villanueva y Kennedy ubicadas en el Distrito Central, mediante bioensayos utilizando la cepa Rockefeller como control; determinar la dosis letal (DL) del temefós (Abate) que produce una mortalidad del 50% y 90% de las larvas procedentes de poblaciones de campo expuestas a distintas concentraciones del larvicida ensayado.

La hipótesis del estudio plantea que el grado de susceptibilidad al larvicida temefós (Abate) de dos colonias de larvas de *Aedes aegypti* establecidas a partir de muestras colectadas en las colonias Manchén, Villanueva y Kennedy ubicadas en el Distrito Central, es similar al grado de susceptibilidad que presenta la cepa de referencia empleada en el estudio.

## CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 El dengue

El dengue es una enfermedad febril producida por un virus perteneciente a la familia *Flaviviridae* y al género *Flavivirus* [del Ángel, 2006]. Se conocen cuatro serotipos o variedades del virus, denominados DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4, los cuales circulan por todo el mundo de forma heterogénea[Varela and M, 2003]. El género *Flavivirus* incluye más de 70 diferentes virus, muchos de los cuales causan importantes enfermedades al hombre, como la fiebre amarilla, fiebre del Nilo occidental, encefalitis de San Louis, encefalitis transmitida por garrapatas, la encefalitis japonesa y el virus del dengue [The Wellcome Trust, 2005].

#### 2.1.1 Distribución del dengue y del *Aedes aegypti*

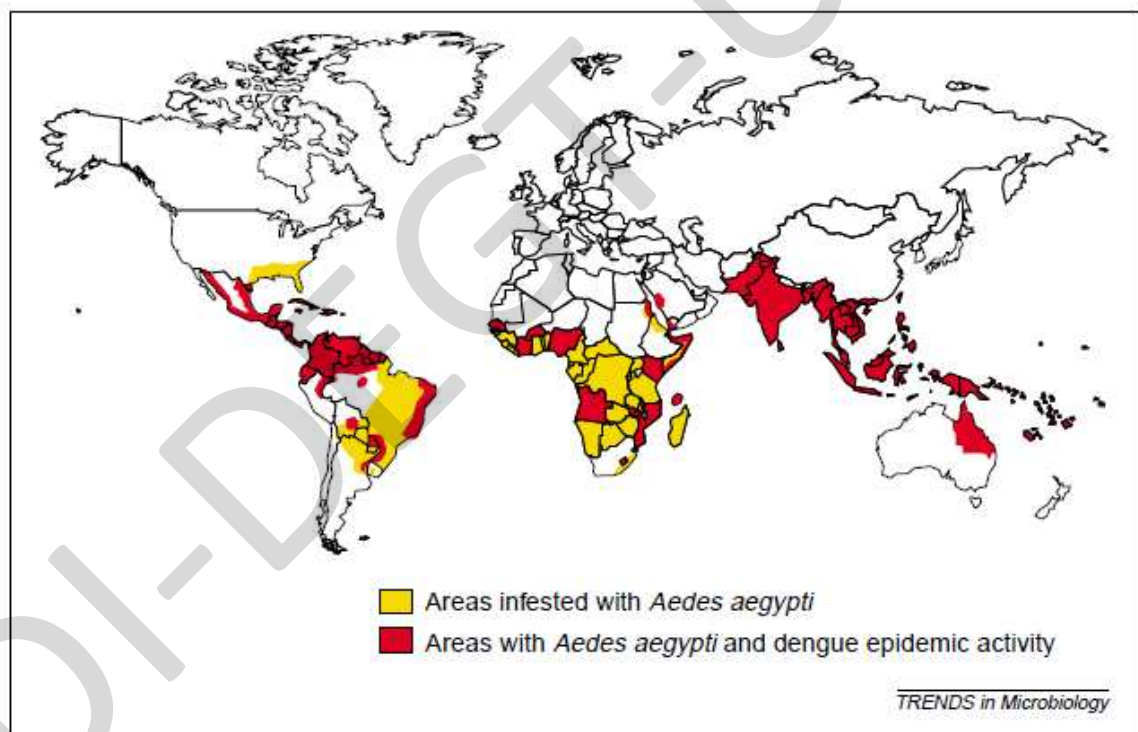
La distribución geográfica de la enfermedad corresponde con la distribución del mosquito vector, el *Aedes aegypti*, e incluye las regiones tropicales y subtropicales del mundo, en donde se encuentran además los países con mayores carencias económicas y de salud [del Ángel, 2006] (Figura 1). La infección por el virus del dengue es un importante problema de salud pública a nivel mundial, ya que se disemina con mucha rapidez incluso en países de regiones templadas como Estados Unidos y Canadá [WHO/TDR, 2009].

#### 2.1.2 Población y áreas afectadas por la enfermedad

En países del Sudeste de Asia como Tailandia e Indonesia, la mayoría de casos de dengue hemorrágico ocurre en niños menores de 15 años, y el promedio de edad de los niños



hospitalizados es de 6 a 8 años [The Wellcome Trust, 2005]. En Centro y Sur América por el contrario todos los grupos de edad se ven afectados, con manifestaciones clínicas similares[Rigau-Pérez et al., 1998]. La incidencia de dengue clásico y dengue hemorrágico siguen en aumento cada año, con picos de transmisión en los meses de lluvia[Rosa-Freitas et al., 2006]. La infección por el virus afecta principalmente las áreas urbanas y semiurbanas, y es considerada una enfermedad reemergente en el trópico y subtropical, presentándose como endémica o epidémica [The Wellcome Trust, 2005].



**Figura 1.** Distribución mundial del dengue en 2001, mostrando el resurgimiento del vector y la enfermedad. Duane J. Gubler, 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever has a public health, social and economic problem in the 21th century [Gubler, 2002].

## 2.2 Importancia del virus del dengue

La fiebre del dengue (llamada también dengue clásico) y su forma severa, la fiebre hemorrágica del dengue, son consideradas las enfermedades transmitidas por vectores más importantes diseminadas en el mundo [Chen and Lee, 2006]. Se estima que 2.5 billones de personas viven en países endémicos para la enfermedad y de 50 a 100 millones se infectan anualmente con el dengue clásico, y 500,000 desarrollan dengue hemorrágico [Pérez-Guerra et al., 2005]. La incidencia ha aumentado 30 veces en los últimos 50 años, aumentando además el número de países en donde antes no se reportaba, y el número de casos en las zonas rurales en la presente década (Figura 2) [WHO/TDR, 2009].

El virus es endémico en más de 100 países, principalmente en las regiones de África, el Sudeste de Asia, el Mediterráneo, el Pacífico Occidental y América, en donde mata a más personas que cualquier otro arbovirus [Troyo et al., 2006]. Para el 2008, en la región de las Américas se reportaron 908,926 casos de dengue clásico y 25,696 de dengue hemorrágico, con 306 casos fatales [Pan American Health Organization, 2008].

En Honduras la enfermedad del dengue fue detectada inicialmente en 1977 en los departamentos de la costa norte y desde esa fecha mantiene un carácter de endemismo en el país [Ávila Montes et al., 2004]. Al igual que en otros países del trópico y subtropico, el control de la enfermedad se realiza mediante el uso de insecticidas tanto para los estados larvales como para los mosquitos adultos. Para el control focal de larvas se utiliza el larvicida organofosforado temefós (Abate), mientras que para el control de los mosquitos adultos se utiliza actualmente el piretroide deltametrina. La resistencia al



## 2.3 Aspectos de la infección y enfermedad del dengue

### 2.3.1 Manifestaciones clínicas del dengue y dengue hemorrágico

Tras una infección por el virus del dengue, las manifestaciones clínicas van desde un proceso asintomático a la aparición de fiebres repentinas, dolor de cabeza, dolor retro orbital, dolor de cuerpo y articulaciones, debilidad, sarpullido, náuseas y vómitos [Troyo et al., 2006]. El periodo de incubación es de 4 a 7 días (puede variar de 3 a 14 días) en los cuales persiste la fiebre y una sensación de cansancio y debilidad que suele durar muchos días después del periodo febril. La gran mayoría de las infecciones en niños menores de 15 años suelen ser asintomáticas o de intensidad menor que en personas adultas[Rigau-Pérez et al., 1998].

Los casos de dengue hemorrágico y síndrome de choque por dengue (la forma más grave de la enfermedad) se caracterizan por presentar trombocitopenia severa, hemorragia leve o aguda, leucopenia y hepatomegalia, aunado a síntomas persistentes como dolores de cabeza, mialgias y artralgias. Se ha observado además que adicionalmente al efecto de la carga viral y al serotipo del virus, una respuesta inmune anormal o deficiente del hospedero tras la infección, puede contribuir a que se desarrolle un dengue hemorrágico [Chiou-Feng et al., 2006]. El principal cambio fisiopatológico que determina la gravedad de la fiebre hemorrágica del dengue y la diferencia de la fiebre de dengue clásico, es la fuga del plasma hacia la matriz extracelular debido a la disfunción endotelial[Rigau-Pérez et al., 1998].

## 2.4 Biología del virus

### 2.4.1 Estructura del virus

El virus del dengue es un virus de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva que contiene entre 10,700 y 10,900 pares de bases (10.7-10.9 kb), envuelto por una nucleocápside icosaédrica rodeada por una envoltura lipídica con un diámetro aproximado de entre 40 a 50 nm [del Ángel, 2006]. El genoma del virus codifica información para la síntesis de por lo menos 10 proteínas, 3 proteínas estructurales: C, M, E y 7 proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 [Mellado-Sánchez et al., 2005]. La proteína E (envoltura), es la responsable de las principales actividades biológicas del virus, como la hemaglutinación, neutralización, unión a receptores celulares y neurotropismo. La proteína M es un polipéptido no glicosilado, localizado en la membrana, que interactúa con la proteína E, así como con el complejo ARN/proteína C [Varela and M, 2003].

Aunque no se conoce con certeza la función de las proteínas no estructurales, se sabe que están ausentes en el virus maduro (virion final) y se necesitan en etapas clave de la replicación viral, como la síntesis de poli proteínas (proteasas) y la replicación del genoma viral [Zhao et al., 1987]. Algunas de ellas tienen importancia desde el punto de vista inmunológico (p. e. NS3 y NS1) ya que inducen la respuesta inmune celular por los linfocitos T CD4+ y CD8+ [Varela and M, 2003]. Se cree que la NS1 interviene en la maduración del virus, ya que se ha visto asociada con la proteína E inmadura. Las proteínas no estructurales NS2A, NS2B, NS4A y NS4B, probablemente intervienen en la síntesis de poli proteínas como la proteasa NS3-NS2B. La NS5 es la proteína viral más

grande y se cree que contiene ARN dependiente de polimerasa de ARN [The Wellcome Trust, 2005].

## 2.5 Transmisión del virus

En América, el virus del dengue permanece en la naturaleza mediante un ciclo de transmisión que sigue la ruta hombre-mosquito-hombre [OPS, 1995]. El ciclo de transmisión en las áreas urbanas comienza con la picadura de un mosquito hembra del género *Aedes*, infectado con el virus, a una persona susceptible o sana. El virus se multiplica dentro del huésped humano, quién ahora es capaz de transmitirlo a un mosquito sano cuando este se alimenta de su sangre. El virus se multiplica en el mosquito y pasa a otro humano susceptible cuando este se vuelve a alimentar [The Wellcome Trust, 2005].

## 2.6 Vector

### 2.6.1 Clasificación Taxonómica

Los mosquitos de la familia Culicidae, en la que se encuentra la especie *Aedes aegypti* (subgénero *Stegomyia* de acuerdo a revisiones taxonómicas actuales) mosquito transmisor del dengue, se clasifican dentro del Orden Díptera (Moscas y mosquitos), Familia Culicidae, subfamilia Culicinae, Tribu Aedini, género *Aedes* (23 subgéneros) con 363 especies (incluida *aegypti*) y la especie *Aedes (Stegomyia) aegypti*, distribuidas en todo el mundo y en la región Neártica [Harbach, 2007]

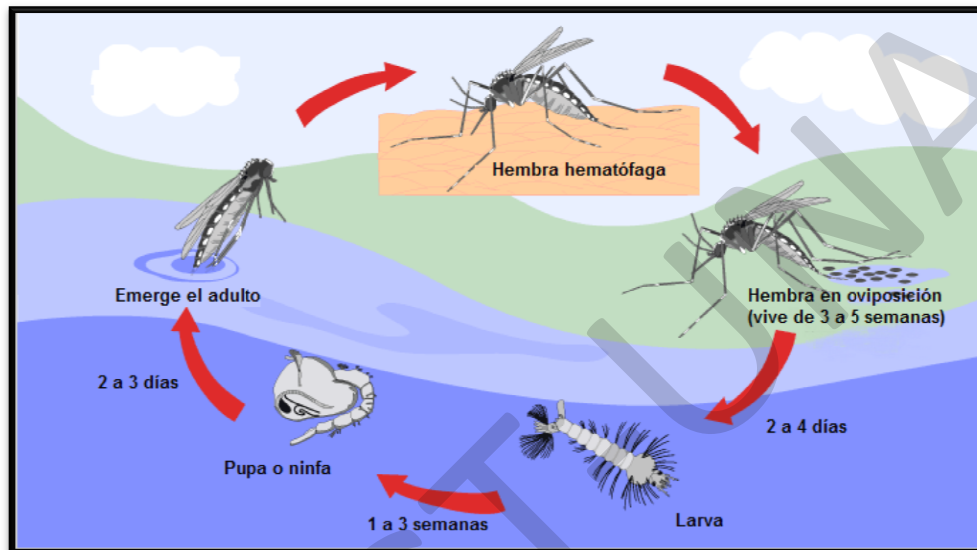
Muchos mosquitos son plagas o vectores de enfermedades que afectan al hombre y a los animales domésticos. Entre los patógenos transmitidos por mosquitos tenemos virus (arbovirus) como la fiebre amarilla y el dengue, gusanos (helminetos) como la filaria, y protozoarios como el *Plasmodium spp.*, agente etiológico de la malaria. Menos de 150 especies conocidas pertenecientes a los géneros *Anopheles*, *Aedes* y *Culex*, son la causa indirecta de mayor morbilidad y mortalidad entre los humanos en relación a cualquier otro grupo de organismos [Harbach, 2007].

## 2.7 Ciclo de vida del vector

Las hembras adultas del mosquito *Aedes aegypti* después de alimentarse de sangre humana, depositan entre 50 y 500 huevos sobre la superficie del agua en diferentes receptáculos artificiales (a veces en hábitats naturales), principalmente en agua limpia. Los huevos eclosionan en condiciones de temperatura y humedad adecuadas, aunque pueden permanecer viables por varios meses (hasta casi un año) en ausencia de humedad. Al eclosionar los huevos comienza el desarrollo de cuatro estadios larvales acuáticos que pueden durar entre 7 y 9 días, pudiendo variar de acuerdo a la temperatura (temperaturas menores a 25°C retardan el crecimiento), alimento y densidad de larvas [The Wellcome Trust, 2005].

Las larvas se alimentan de bacterias y flotan sobre la superficie para respirar. Al completarse los cuatro estadios larvales, se desarrolla una pupa o ninfa, la cual puede durar entre 2 y 3 días a 25°C. En esta etapa cesa la alimentación y se distinguen dos regiones corporales: cefalotórax y abdomen. Cuando la pupa está completamente formada, comienza a respirar aire, la presión interna aumenta y emerge el mosquito

adulto, quien se apareará alrededor de 24 horas después de emerger. Después de aparearse, las hembras inseminadas podrán alimentarse de sangre en un lapso de entre 24 y 36 horas (Figura 3) [The Wellcome Trust, 2005].



© Trust, 2005

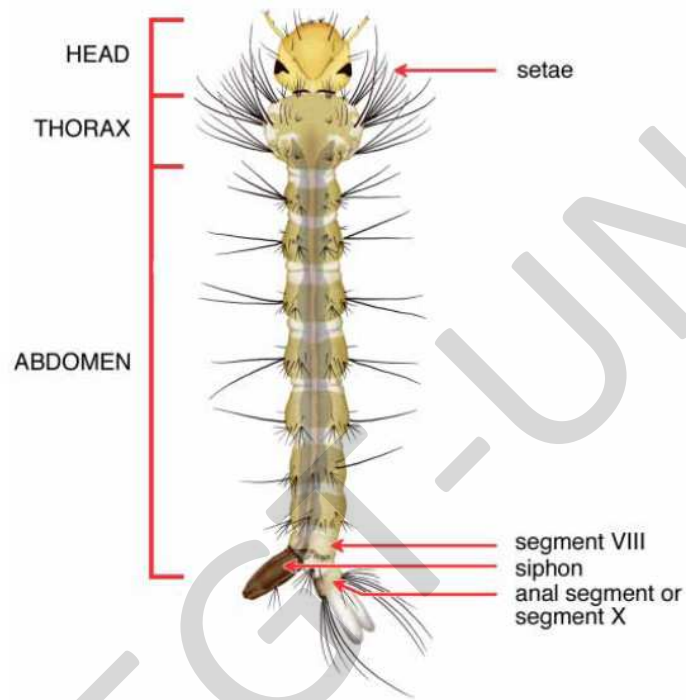
## 2.8 Morfología de larva y adulto

### 2.8.1 Características de la larva

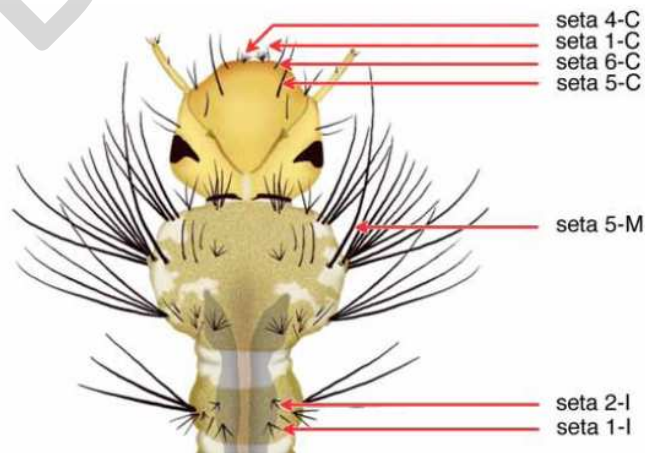
La fase de larva es esencialmente acuática, móvil y con cuatro estadios de desarrollo en los que se incrementa el tamaño y se definen características taxonómicas reconocibles [Rossi and Almirón, 2004]. El cuerpo está dividido en tres regiones densamente cubiertas de setas (“pelos”): cabeza, tórax y abdomen (Figura 4). Cabeza: las antenas son cerca de la mitad de la longitud de la cabeza y carecen de espículas. La seta 4-C se ubica por delante de la seta 6-C, y posee de 4 a 7 ramificaciones cortas (Figura 5).



Tórax: espinas laterales muy evidentes. Abdomen: ocho segmentos abdominales, el sifón esta moderadamente pigmentado y posee un peine (“pecten”) de espinas con dos o más dentículos sub-apicales (Figura 6).

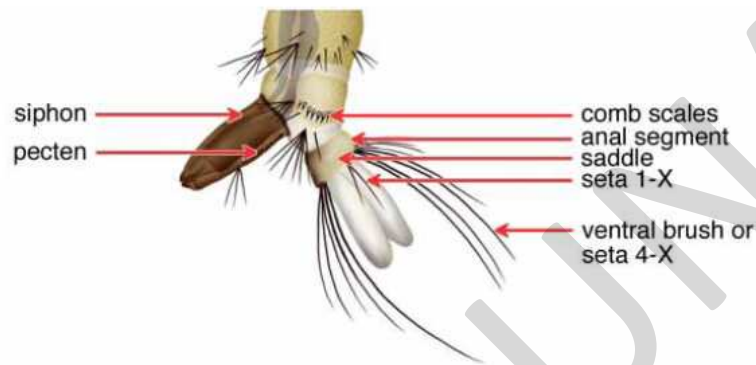


**Figura 4.** Vista dorsal de una larva de mosquito del género *Aedes* (vista lateral de los segmentos VIII y X). Fuente: Rueda, 2004.



**Figura 5.** Vista dorsal de la cabeza, tórax y abdomen (en parte) de una larva del género *Aedes*. Fuente: Rueda, 2004.

Abdomen: brocha ventral (4-X) formada por cinco pares de setas; de seis a doce dientes en el peine (“combscales”) del segmento abdominal VIII dispuestos en una fila y con espinas sub-apicales presentes (Figura 6).



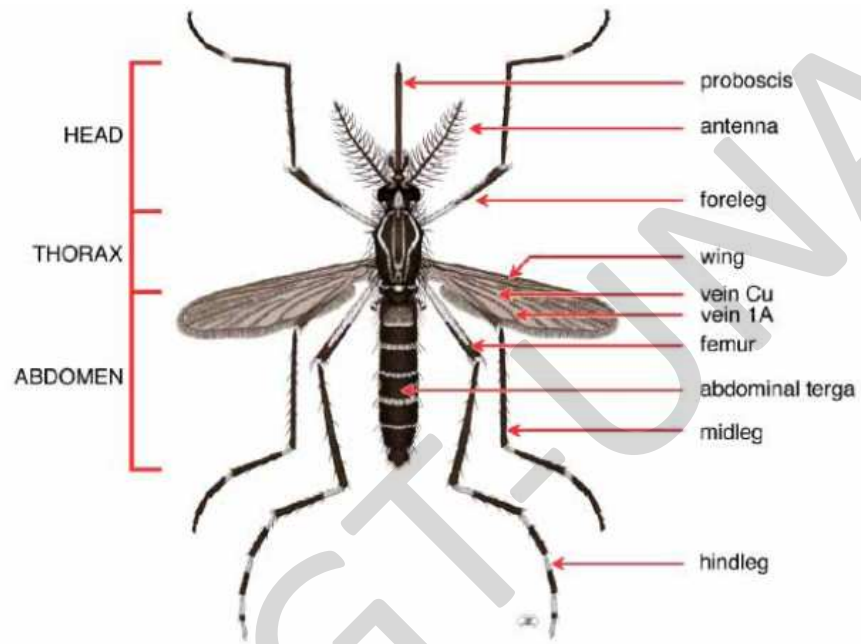
**Figura 6.** Vista lateral del abdomen (en parte) de una larva del género *Aedes*. Fuente: Rueda, 2004.

### 2.8.2 Características del adulto

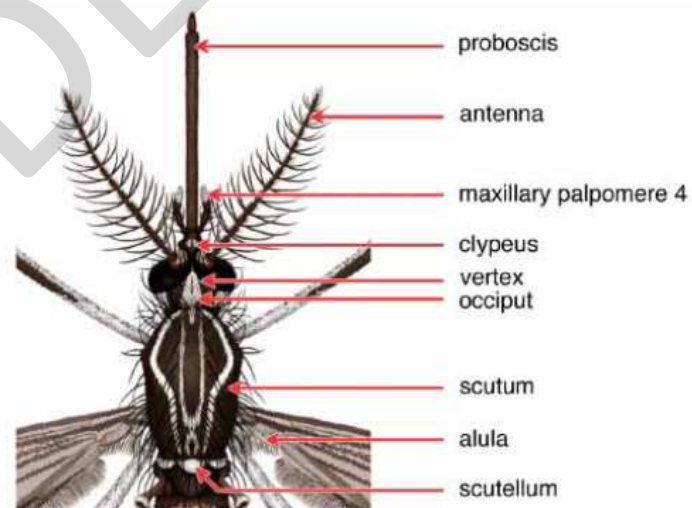
Los machos son más pequeños que las hembras y poseen antenas más pilosas (con un mayor número de ramificaciones). El pico (“proboscis”) es largo, de tipo chupador en machos y picador-chupador en las hembras. Tanto machos como hembras poseen una coloración oscura (castaño o negro) con ornamentaciones contrastantes de color blanco plateado sobre la cabeza, escutelo (scutum), patas y abdomen (Figura 7). *Ae. aegypti* se distingue de otras especies del género debido a que el tórax presenta un característico diseño en forma de “lira” sobre el escutelo (Figura 8) [Becker et al., 2010].

Cabeza: Clípeo (“clypeus”) con escamas blancas; palpos maxilares (a ambos lados de la proboscis) más largos en machos que en hembras. Tórax: escutelo de color negro o

castaño con un par de rayas blancas en posición longitudinal-sub medial, formando además un diseño en forma de lira; porción anterior del fémur de la pata media con una raya blanca longitudinal [Rueda, 2004].



**Figura 7.** Vista dorsal de una hembra adulta de *Aedes aegypti*.  
Fuente: Rueda, 2004.



**Figura 8.** Vista dorsal de la cabeza y tórax de un mosquito *Aedes aegypti*. Fuente: Rueda, 2004.

## 2.9 Ecología del vector

### 2.9.1 Hábitat (Sitios de ovipostura/criaderos)

Una de las características que distingue a *Aedes aegypti* de otras especies de mosquitos es su habilidad de completar su desarrollo pre adulto en una gran variedad de recipientes naturales y artificiales; esto unido al aumento acelerado en el número de criaderos larvales generados por la actividad como consecuencia de patrones culturales y tradicionales, garantiza una permanente disponibilidad de criaderos potenciales para esta especie [Mazine et al., 1996].

Estudios realizados en Cuba reportan la presencia de este mosquito en diferentes tipos de depósitos artificiales, floreros, charcos de agua, huecos de árboles, estanques y recipientes de almacenamiento de agua para el consumo humano [García, 1977; Pérez, 1956]. En muestreos realizados en 11 islas del Caribe durante 1983-1989, se encontraron 54 hábitats potenciales para la cría de mosquitos por casa y se llamo la atención sobre la significación sociológica de los recipientes por viviendas, junto a la ecología de las larvas de *A. aegypti* para el desarrollo exitoso de un programa de erradicación [Nathan and Knudsen, 1991].

El mosquito *Aedes aegypti* es considerada una especie altamente antropofílica ya que prefiere criaderos ubicados dentro y fuera de las casas en áreas urbanas, depositando sus huevos en recipientes artificiales que contienen agua limpia almacenada [Ponlawat and Harrington, 2005]. En ambientes naturales, las hembras depositan los huevos en cualquier receptáculo que contenga agua, como huecos en árboles [Tsunoda et al., 2010]. Los

recipientes en donde suelen depositarse los huevos son muy variados, varían localmente de país a país, y están estrechamente relacionados al almacenamiento de agua y al manejo de desechos sólidos [The Wellcome Trust, 2005].

Entre los principales sitios de anidamiento (puesta de huevos) tenemos micro y macro-ambientes dentro y alrededor de las casas, como llantas usadas, pilas, cisternas o tanques de almacenamiento, barriles (de madera, metal o plástico), cántaros o jarros, macetas para plantas, latas descartadas (pintura, alimentos), celdas de batería de automóvil descartadas, bromelias (plantas), agujeros en árboles, bebederos de animales, botellas (plástico o vidrio), canales de desagüe, entre otros (Figura 4). Dentro de las casas los más comunes son los floreros, las bases de macetas y contenedores pequeños como botellones o baldes plásticos [The Wellcome Trust, 2005]. Muchas veces la presencia de vertederos cerca de ríos y quebradas o cerca de los domicilios, depósitos de chatarra, patios con acumulación de basura, proveen espacios en donde los mosquitos pueden prosperar [Pérez-Guerra et al., 2005].

### 2.9.2 Comportamiento de alimentación del mosquito

Se sabe que tanto la sangre como el azúcar son alimentos fundamentales para la supervivencia y la reproducción de las hembras de mosquitos [Rui-De et al., 2008]. Sin embargo, para la mayoría de las especies de mosquitos, la sangre constituye un alimento esencial para producir huevos viables, ya que las proteínas contenidas en esta, aseguran una mejor calidad. En experimentos de laboratorio se ha observado que las hembras de *Aedes* y *Anopheles* mantenidas con sangre de animales vivos, ponen un mayor número de huevos durante su vida y viven mucho más que aquellas alimentadas únicamente con

azúcar. Se han utilizado exitosamente varias especies de animales vivos como fuente de sangre, como ratones, ratas, cobayos, hámsteres, jerbos, conejos, pollos, monos e incluso humanos [Pothikasikorn et al., 2010].

Los mosquitos difieren en sus hábitos de alimentación y reposo. Especies que prefieren alimentarse en el interior de las viviendas son llamadas endofágicas, mientras que las que se alimentan en el exterior se denominan exofágicas. Las hembras que reposan en exteriores después de alimentarse, son llamadas exofílicas, y las que lo hacen en interiores endofílicas. Existen especies ornitofílicas ya que prefieren alimentarse de sangre de aves, zoofílicas cuando se alimentan de otras especies animales y antropofílicas cuando su principal fuente de alimento es el hombre [Becker et al., 2010].

### 2.9.3 Actividad del mosquito

*Aedes aegypti* es un mosquito que pica principalmente en horas del día, aunque puede alimentarse por la noche de acuerdo a la disponibilidad de huéspedes humanos y de las horas en las que estos están activos. Esta característica en el comportamiento alimenticio del vector, explica por qué las mujeres y los niños en edad pre-escolar, son el grupo con mayor riesgo de contraer dengue. Durante el día, hay dos momentos en los que el mosquito es más activo: en las primeras horas de la mañana, y las últimas horas de la tarde. El mosquito puede picar más de una vez y a más de una persona cada vez que se alimenta. Las hembras adultas de *A. aegypti* se alimentan muchas veces antes de completar su ciclo gonadotrópico (ciclo de puesta), el cual requiere dos o más días para que la hembra pueda digerir el alimento, poner los huevos y volver a alimentarse [The Wellcome Trust, 2005].



**Figura 9.** Criaderos comunes de *Aedes aegypti*. (1) Llantas; (2) Pilas, lavabos; (3) Tanques elevados; (4) Barriles; (5) Cantaros o jarrones; (6) Floreros; (7) Latas de pintura; (8) Ladrillos huecos; (9) Huecos en árboles; (10) Juguetes; (11) Bromelias; (12) Latas descartadas; (13) Bebederos de animales; (14) Botellas; (15) Restos de botellas en muros; (16) Canales de desagüe. Tomado de Wellcome Trust, 2005 (adaptado de J. Moquillaza/OPS).

#### 2.9.4 Oviposición

Las hembras ponen sus huevos en muchos sitios diferentes durante un ciclo gonadotrópico, un comportamiento llamado “salto de oviposición” el cual se sugiere es una estrategia para evitar el hacinamiento en sitios donde el alimento para las larvas podría escasear [Tsunoda et al., 2010]. Se ha observado que algunos contenedores de agua son pasados por alto durante la puesta de huevos, y aunque no se tiene claro qué factores

determinan la idoneidad de los sitios de puesta, una característica común es la presencia de agua limpia con algunos detritos[Hemme et al., 2009].

#### 2.9.5 Desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario comienza casi inmediatamente después que los huevos han sido depositados sobre una superficie cercana al agua. El periodo de tiempo para que los embriones estén completamente formados, varía entre 2 y 7 días (o más) dependiendo de la temperatura. Temperaturas cercanas a los 30 °C favorecen un desarrollo más rápido [Becker, 1989].

#### 2.9.6 Eclosión

Los mosquitos del género *Aedes* han desarrollado un sofisticado mecanismo el cual regula el proceso de eclosión, como una adaptación a las fluctuantes condiciones abióticas existentes en cuerpos de agua temporal, donde estos anidan. Después de la puesta de los huevos (generalmente en los meses de verano), los embriones entran en un estado de diapausa que asegura la eclosión hasta que las condiciones climáticas e hidrológicas permitan el desarrollo de las larvas hasta su estado adulto [Becker et al., 2010].

### **2.10 Control del vector**

#### 2.10.1 Uso de controles biológicos

El control biológico, en un sentido amplio, se define como la reducción de una población blanco mediante el uso de organismos depredadores, parásitos, patógenos, competidores o toxinas producidas por microorganismos[Woodring and Davidson, 1996]. El control



biológico de larvas y pupas de *Aedes aegypti* mediante el uso de organismos depredadores y parásitos, es una alternativa viable y segura al tradicional uso de insecticidas químicos, ya que a diferencia de estos últimos, no tienen un impacto nocivo sobre el medio ambiente y tampoco inducen resistencia [Marti et al., 2004].

#### 2.10.2 Historia del uso de insecticidas

Muchos de los esfuerzos por combatir enfermedades transmitidas por vectores se han centrado en la eliminación del vector mediante el uso de insecticidas, que en muchos casos, ha sido el único método viable para controlar las enfermedades. Algunos ejemplos son las campañas de fumigación a gran escala con DDT en la década de 1950 y 1960 que redujeron drásticamente la prevalencia de malaria en Asia y los programas de fumigación aérea con temefós contra la oncocercosis (ceguera de los ríos) en zonas ribereñas de África occidental entre 1970 y 1980 [Paul et al., 2006].

Entre 1940 y 1950, se logró disminuir la prevalencia del dengue y de otras enfermedades transmitidas por mosquitos en muchas partes del mundo con la introducción de insecticidas orgánicos sintéticos [Thacker, 2002]. Así mismo, una campaña de erradicación de *A. aegypti*, mosquito vector del dengue, llevada a cabo entre las décadas de 1960 y 1970 en América por la Organización Mundial de la Salud (OMS), logró reducir la incidencia de la enfermedad. Sin embargo, debido a que no se continuó con la vigilancia y con las medidas de control, hubo reinfestaciones posteriores del mosquito que conllevaron a la aparición de brotes en países del Caribe, Centro y Suramérica [WHO/TDR, 2009].

El mosquito *A. aegypti* es el principal vector del virus del dengue en América, y en la mayoría de los países del sudeste de Asia [Hammond et al., 2007]. Las estrategias de control del vector se han basado en el uso de productos químicos y controles biológicos dentro de programas de manejo medio ambiental [Duque Luna et al., 2004]. Para la década de 1990 fue evidente en muchos países de América, la necesidad de involucrar a las comunidades, con el fin de lograr programas sostenibles de control, tanto en la planificación como en la ejecución de las acciones [Sánchez et al., 2008].

El costo económico y social del dengue es muy alto, especialmente en países endémicos para la enfermedad, en los que la pérdida de la capacidad productiva debido a la enfermedad, compromete su bienestar laboral. Esta pérdida prematura del estado de salud de la población, se ha calculado mediante un indicador en salud denominado DALY (Disability Adjusted Life Years) o AVAD (Años de vida ajustados por discapacidad), el cual corresponde a los años de vida saludable perdidos por enfermedad, que en la infección por dengue, está en el rango de 420 a 658 por cada millón de habitantes por año [Hammond et al., 2007].

### 2.10.3 Clasificación de insecticidas

Los insecticidas usados para el control de mosquitos pertenecen a cuatro grandes grupos químicos: (1) Hidrocarburos clorados; (2) Organofosfatos (OP); (3) Carbamatos; y (4) Piretroides. También se utiliza un grupo especial denominado reguladores del crecimiento (IGR), que junto con los anteriores, se agrupan como insecticidas de segunda generación. Además, preparaciones comerciales a base de bacterias han estado disponibles como agentes microbianos desde comienzos de 1980y han constituido un componente

importante en los programas de control de mosquitos en Europa y Estados Unidos de Norteamérica [Becker et al., 2010].

#### 2.10.4 Efectos del control químico

En enfermedades como el dengue, para la cual aún no se cuenta con una vacuna que proteja contra la infección de los cuatro serotipos del virus, la prevención y la reducción en la transmisión de la enfermedad continúa dependiendo en forma exclusiva del control del vector [Kongmee et al., 2004]. Las intervenciones con insecticidas sintéticos siguen siendo necesarias para controlar la explosión poblacional de mosquitos, particularmente cuando surgen brotes epidémicos, sin embargo; el uso prolongado de estos productos ha generado contaminación ambiental, efectos tóxicos en mamíferos, efectos adversos en otros organismos, y el desarrollo generalizado de resistencia en poblaciones del mosquito [Sutthanont et al., 2010].

A pesar de los potenciales efectos adversos, el uso de insecticidas sintéticos puede reducir significativamente la transmisión de enfermedades transmitidas por artrópodos, como es el caso de la malaria, la cual ha reducido su tasa anual de mortalidad de 6 millones en 1939 a 2.5 millones en 1965, y a cerca de 1 millón en 1991. Avances similares se han alcanzado en otras importantes enfermedades tropicales como la fiebre amarilla, enfermedad del sueño, virus del Nilo Occidental y la enfermedad de Chagas [Yu, 2008].

Por lo anterior, y debido particularmente a la aparición de mecanismos de resistencia a los insecticidas más ampliamente usados, es necesario implementar sistemas de control integrales, en los que se combinen diferentes estrategias junto con el tratamiento con insecticidas, como el uso de controles biológicos e inhibidores del crecimiento de las

larvas del vector, métodos que han demostrado ser eficaces [Krysan and Dunley, 2010]. Además, se necesita la voluntad política, coordinación intersectorial, participación activa de la comunidad, y el fortalecimiento de la legislación nacional, para lograr un enfoque ecosistémico que asegure mejores resultados a futuro [Sánchez et al., 2008].

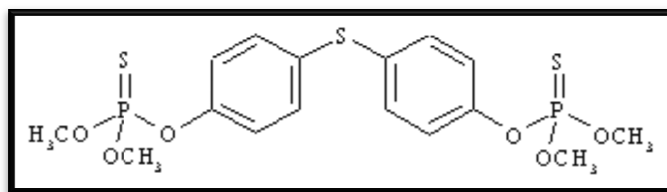
## **2.11 Ficha técnica del insecticida temefós**

### 2.11.1 Introducción

El temefós, comúnmente conocido por una de sus fórmulas comerciales de nombre Abate (grado técnico 98%), ha sido y sigue siendo el plaguicida de mayor uso en las Américas, Particularmente en programas de salud pública para el control de larvas del mosquito transmisor del dengue, *Aedes aegypti* [Red Latinoamericana de control de vectores, 2005].

### 2.11.2 Descripción del temefós

El temefós es un plaguicida organofosforado, no sistémico, que actúa por contacto e ingestión. Interfiere la transmisión de los impulsos nerviosos por inhibición de la acetilcolinesterasa. Se utiliza principalmente como adulticida y larvicida en diversos grupos de insectos y otros animales. Su nombre químico (IUPAC) es 0,0,0,0'-tetrametil-0,0'-tio-di-p-fenile bis(fosforotioato); su número químico de identificación es N° CAS 3383-96-8; su fórmula global es  $C_{16}H_{20}O_6P_2S_3$ . Tiene un peso molecular de 466.48kd y su estructura química se describe en la Figura 10 [Instituto Nacional de Ecología de México, 2009].



**Figura 10.** Estructura química del temefós. Fuente: Instituto Nacional de Ecología de México (INE), 2009.

Por sus propiedades fisicoquímicas, el temefós está dotado de un elevado coeficiente de reparto octanol/agua, que favorece su absorción en los sedimentos y su acumulación en los tejidos de los organismos vivos en condiciones naturales. No obstante, los estudios en medios acuáticos muestran una degradación relativamente rápida del compuesto parente (50% degradado en 15 a 17 días). Es además un compuesto liposoluble, pero se degrada con bastante rapidez [Bisset et al., 2005].

Las formulaciones líquidas de temefós contienen disolventes orgánicos que pueden ser inflamables y peligrosos al ser expuestos al calor. En caso de combustión se desprenden gases tóxicos e irritantes. Entre otras formulaciones, el mercado ofrece algunos productos de liberación lenta debajo costo y largo efecto residual [Bisset et al., 2005].

### 2.11.3 Usos del temefós

El temefós es de uso industrial y urbano. En el primer caso se utiliza en plantas formuladoras de plaguicidas, como ingrediente activo. En el medio urbano se usa en el control de arañas, alacranes, chinches, cucarachas, pulgas, hormigas, moscas, mosquitos culícidos (mosquitos con un par de alas y cuyas larvas se desarrollan en el agua), gusano rojo del arroz y triatóminos (chinches que se alimentan de sangre), entre otros. Resulta

especialmente activo contra larvas de mosquitos, jejenes, piojos domésticos, catarinita de la papa y otros insectos. Se aplica manualmente en forma granulada (en recipientes que contienen agua almacenada) y en forma aérea mediante rociado utilizando un aeroplano [RAP-AL, 2009].

En el ámbito sanitario, el temefós se usa a nivel mundial en campañas de salud pública para el control de larvas de mosquitos, especialmente de *Aedes aegypti*, principal vector del dengue en el hemisferio occidental. Para eliminar las larvas de *A. aegypti* en su fase de desarrollo, se aplica temefós en los depósitos de agua donde se encuentran, desde recipientes de uso doméstico hasta aguas con mareas, aguas estancadas, charcos, ciénagas, lagos, lagunas y pantanos [Instituto Nacional de Ecología de México, 2009].

El recrudecimiento de la enfermedad en América Latina se debe a un mayor número de criaderos de mosquitos y en algunos casos al desarrollo de resistencia de los insectos a los productos insecticidas comerciales en uso [RAP-AL, 2009].

#### 2.11.4 Efectos en la salud del hombre

Los seres humanos pueden absorber el temefós por inhalación, ingestión, por la piel y por los ojos. Se sabe que en su presentación urbana, y utilizado siguiendo las indicaciones del fabricante, el temefós no es tóxico para los humanos, siempre y cuando no se utilice en concentraciones por arriba de 1 ppm (1 mg/l) en fuentes de agua para consumo [RAP-AL, 2009].

## 2.12 Evaluación de la resistencia a temefós en distintas regiones del mundo

### 2.12.1 Hallazgos en el Sudeste de Asia

En la ciudad de Kuala Lumpur, estado de Selangor, Malasia, Chen et al (2005) llevaron a cabo bioensayos para determinar la susceptibilidad en poblaciones de *A. aegypti* y *A. albopictus* al larvicida organofosforado temefós. La colecta de muestras se llevó a cabo en cuatro localidades seleccionadas por el alto número de casos reportados. Los resultados de las pruebas mostraron que tanto *A. aegypti* como *A. albopictus* habían desarrollado resistencia al temefós, con valores de mortalidad por debajo del 60% después de 24 horas de tratamiento [Chen et al., 2005].

En otro estudio realizado en Malasia, en donde se determinó la tasa de resistencia de larvas de *A. aegypti*, *A. albopictus* y *Culex quinquefasciatus* a los organofosforados temefós y malatión y al piretroide permetrina, se demostró que ambas especies de *Aedes* eran tolerantes al temefós y que *C. quinquefasciatus* desarrolló alta resistencia al malatión y permetrina [Hamdan et al., 2005].

En Tailandia, se han realizado análisis bioquímicos para determinar el rol de ciertas enzimas en la adquisición de resistencia por parte de *A. aegypti* y *A. albopictus* a diferentes insecticidas. Los resultados muestran que la actividad de oxidasas de acción múltiple podría ser responsable de la resistencia de *A. aegypti* a piretroides, mientras que una mayor actividad de estererasas no específicas puede conferir resistencia a organofosforados [Pethuan et al., 2007].

### 2.12.2 Hallazgos en América

En Cuba y Venezuela, en donde las primeras epidemias de dengue hemorrágico se presentaron en la década de 1980, se han realizado bioensayos para detectar el grado de susceptibilidad de *A. aegypti* a diferentes insecticidas (en su mayoría adulticidas a excepción de temefós). Rodríguez et al (2001) ensayaron ocho diferentes insecticidas: temefós, malatión, fentión, metil-pirimifós, clorpirifós (organofosforados), deltametrina, lambdacialotrina y cipermetrina (piretroides), comparando cuatro cepas de *A. aegypti*, una de Cuba y tres de Venezuela. En este estudio encontraron que las cepas de Venezuela presentaron un bajo nivel de resistencia a fenitrotión y malatión, pero un nivel mayor de resistencia a temefós, metil-pirimifós y clorpirifós. Además, todas las cepas fueron susceptibles a piretroides, excepto la cepa de Cuba, la cual mostro un nivel moderado de resistencia a cipermetrina [Rodríguez et al., 2001].

En un estudio más reciente, Rodríguez et al (2004), utilizando tres cepas de *A. aegypti*, dos cepas provenientes de dos consejos populares del Municipio de Guanabacoa, Provincia de la Habana, Cuba (zonas con altos índices de infestación del mosquito), y una cepa de referencia (Rockefeller), encontraron que las larvas ensayadas eran completamente susceptibles a los organofosforados malatión, clorpirifós, metil-pirimifós y al carbamato propoxur, pero altamente resistentes a temefós y fentión [Rodríguez et al., 2004].

En Lima, Perú, tras una evaluación del efecto residual del temefós en larvas de *A. aegypti* encontradas en tanques de concreto en el distrito de San Juan de Lurigancho, al norte de Lima, los resultados difirieron cuando se comparó la mortalidad de las larvas en



condiciones de campo y laboratorio, durante un periodo de 14 semanas. Los resultados demostraron que en los tanques de concreto tratados con 1 ppm de temefós, la mortalidad se mantuvo en 99,7% después de 24 horas de tratamiento y no se evidenció recolonización hasta la semana 14, en el laboratorio se evidenció una disminución semanal de 11% de la mortalidad desde la séptima semana. Se concluyó que no hubo evidencia en condiciones de campo de eficacia residual disminuida del temefós a la 14.<sup>a</sup> semana de aplicación. Este tipo de estudios pueden ser muy útiles si se realizan de forma rutinaria, ya que podrían proporcionar evidencia de la eficacia del temefós en las localidades con altos índices de infestación del mosquito vector del dengue [Palomino S et al., 2006].

En El Salvador, un estudio realizado por Bisset et al (2009), evaluó la resistencia a insecticidas de una cepa de *A. aegypti* procedente del municipio de Soyapango, Departamento de San Salvador, El Salvador. El objetivo del estudio era el de evaluar el nivel de susceptibilidad a insecticidas de muestras colectadas localmente y describir los posibles mecanismos de resistencia al temefós. Dicha evaluación se realizó mediante bioensayos utilizando como control la cepa susceptible Rockefeller. Los resultados del estudio mostraron una alta resistencia a temefós por parte de las larvas estudiadas, con un factor de resistencia ( $FR_{50}=24,16$ ) [Bisset et al., 2009].

No se conoce la situación actual sobre el grado de susceptibilidad del vector al control químico usado en el país, ya que no hay datos publicados sobre el tema, por lo que se necesita estudiar la respuesta del vector tanto al tratamiento focal con temefós (Abate) como al control de los mosquitos adultos.

El presente estudio aporta datos sobre el nivel de susceptibilidad de larvas de *A. aegypti* al larvicida temefós (Abate), y de esa forma contribuir con las autoridades de salud del país en la toma de decisiones sobre las acciones a tomar en el presente y en futuro para lograr un control efectivo del vector del dengue y reducir el impacto de la enfermedad en el país.

### **2.13 Bioensayos de respuesta cuantitativa**

Un bioensayo es un experimento en el que se utilizan organismos vivos como sujetos de prueba o experimentación. Cuando se aplica un estímulo (de origen físico, químico o biológico), los organismos responden. Un bioensayo proporciona un medio para cuantificar la respuesta o respuestas. Una “respuesta cuantitativa” es aquella que varía en relación a una característica medible o cuantificable del estímulo. Los “bioensayos de respuesta cuantitativa” se realizan para estimar la relación entre la respuesta (o respuestas) y la cantidad o intensidad de un estímulo [Robertson et al., 2007].

Actualmente, la realización de bioensayos para evaluar la resistencia de insectos de interés sanitario a los principales grupos de insecticidas comerciales, constituye la metodología más ampliamente usada en el mundo, ya que permiten calcular tanto el grado de tolerancia de un grupo de organismos ha determinado agente químico, como la toxicidad relativa de dicho agente [Robertson and Preisler, 1992]. Existen muchos modelos estadísticos para el análisis de bioensayos, siendo las funciones de distribución “normal” y “logística” las dos más utilizadas mediante los métodos de regresión “probit” o “logit” respectivamente [Hastings and Peacock, 1974].

## 2.14 Análisis Probit

### 2.14.1 Introducción

El método probit es un tipo de análisis de regresión utilizado para analizar los resultados de experimentos dosis-respuesta o de respuesta binomial en diversas disciplinas de la ciencia. Es comúnmente usado en toxicología para determinar la toxicidad relativa de productos químicos en organismos vivos. Ha sido ampliamente utilizado por muchos años para el análisis de datos obtenidos en bioensayos, incluyendo la respuesta de lotes de insectos a insecticidas [Russell et al., 1977].

El modelo probit mide la relación entre la intensidad de un estímulo y la proporción de casos que presentan una cierta respuesta a dicho estímulo. Es útil en situaciones en las que se dispone de una respuesta dicotómica que se piensa puede estar influenciada o causada por los niveles de alguna o algunas variables independientes, y es particularmente adecuada para datos experimentales [Castillo, 2004].

### 2.14.2 Establecimiento de una relación dosis-respuesta

Partiendo de concentraciones o dosis conocidas de un determinado producto químico (o biológico), se asignan al azar lotes de insectos para cada concentración. Se expone cada lote a una dosis por un periodo de tiempo predeterminado. Al término del tiempo, se registra tanto el número total ( $n$ ) de insectos en cada lote, como el número de individuos muertos o sobrevivientes ( $r$ ) por lote. Los resultados obtenidos (mortalidad o supervivencia) se expresan como proporción ( $r/n$ ) o como porcentaje ( $r/n \times 100$ ) [Frutos, 1996], siguiendo la ecuación:

$$p = (r/n) \times 100$$

Donde:

$p$  = porcentaje de efecto

$r$  = número de organismos muertos o afectados

$n$  = número total de individuos por lote

Sin embargo, para poder construir una línea de regresión es necesario considerar además las concentraciones del insecticida ( $d$ ) utilizadas en los bioensayos. La representación gráfica de  $p$  vs  $d$ , o relación dosis-respuesta, genera una curva sigmoidea que muchas veces presenta dificultades en la construcción de un modelo lineal. Esto se soluciona transformando  $d$  a una escala logarítmica ( $X = \text{Log}_{10}(d)$ ), lo cual mostrará una relación dosis-respuesta de forma “S” o sigmoidea normal. De esta manera la distribución de  $p$  vs  $X$  será normal [Castillo, 2004].

Posteriormente, mediante las tablas de probit, se transforma  $p$  (porcentaje de efecto) a unidades probit buscando en una tabla de distribución normal el valor de  $z$  en la tabla correspondiente a una probabilidad acumulada igual a  $p$  y sumándole a continuación cinco unidades (se suma esta cantidad para trabajar con números positivos). Finalmente se obtiene una distribución de puntos en un sistema bivariado de tipo lineal, los cuales se procesan según un análisis de regresión típico [Frutos, 1996].

En un bioensayo de respuesta cuantitativa, los puntos a lo largo de la línea de regresión son tales que para una dosis o concentración dada sobre el eje de las “X” hay un correspondiente nivel de probabilidad de respuesta. La dosis que corresponde con un

nivel de probabilidad específico se conoce como “dosis letal” (DL) para ese nivel. El parámetro más utilizado es la  $DL_{50}$ , y se refiere a la dosis necesaria para matar el 50% de los individuos de una población susceptible al producto utilizado. Este parámetro permite conocer la efectividad de un producto mediante el análisis de su toxicidad y potencia relativa [Robertson et al., 2007].

Cabe enfatizar que el análisis probit es una transformación sobre la tasa de efecto ( $p$ ), y la ecuación generada es la siguiente:

$$y = a + bx$$

Donde:

$y$  = (expresado en unidades probit)  $z + 5$

$z$  = variable normal estándar =  $z_0$  tal que la probabilidad ( $z < z_0$ ) =  $p$

$a$  y  $b$  = estimadores de los parámetros de la línea de regresión

Así, cuando  $p = 50\%$  entonces  $y = 5$ , por lo tanto:

$$x_5 = \text{Log}_{10} DL_{50}, \text{ entonces } DL_{50} = 10^{x_5}$$

Para facilitar los cálculos puede hacerse uso de software estadístico que incluya el análisis probit como Polo-Pc versión 1.0 para MS-DOS o su versión más actualizada, Polo-Plus 2.0 para Windows. Este último puede ser obtenido en la Website de LeOra Software Company.

## **CAPITULO 3. METODOLOGÍA**

### **3.1 Objetivos**

#### 3.1.1 Objetivo general:

Evaluar la susceptibilidad al insecticida temefós (Abate) en larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) colectadas en el Distrito Central, Francisco Morazán.

#### 3.1.2 Objetivos específicos:

Determinar el grado de susceptibilidad al larvicida temefós (Abate) de larvas de *Aedes aegypti* colectadas en las colonias Manchén, Villanueva y Kennedy ubicadas en el Distrito Central, mediante bioensayos utilizando la cepa Rockefeller como control.

Determinar la dosis letal (DL) de temefós (Abate) que produce una mortalidad del 50% y 90% de las larvas procedentes de poblaciones de campo expuestas a distintas concentraciones del larvicida ensayado.

### **3.2 Hipótesis**

El grado de susceptibilidad al larvicida temefós (Abate) de dos colonias de larvas de *Aedes aegypti* establecidas a partir de muestras colectadas en las colonias Manchén, Villanueva y Kennedy ubicadas en el Distrito Central, es similar al grado de susceptibilidad que presenta la cepa de referencia empleada en el estudio.

### **3.3 Diseño del estudio:**

Bioensayos de respuesta binaria cuantitativa con una variable independiente.

### **3.4 Periodo de estudio**

El estudio se llevó a cabo entre los meses de febrero y agosto de 2011, comprendiendo un periodo de 28 semanas que abarcaron tanto la estación seca (noviembre-abril) como el inicio de la estación lluviosa (mayo-octubre). En el mes de enero se elaboraron tanto las ovitrampas como las jaulas para la cría de los mosquitos adultos, además de adquirir el equipo y los materiales necesarios para la realización de los bioensayos. En el mes de febrero se crió una tercera parte de los huevos de la cepa Rockefeller y se colectó una población preliminar de huevos y larvas de *Aedes aegypti* del campo para realizar una prueba de estandarización tanto de las condiciones del área de trabajo como de los procedimientos de colecta y de ejecución de los bioensayos. En los meses siguientes se criaron tanto los huevos colectados en el campo como los restantes huevos de la cepa Rockefeller y se realizaron los bioensayos con diferentes concentraciones de temefós.

### **3.5 Población de estudio**

Larvas F1 de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de 3er o 4to estadio, de tamaño uniforme, que fueron obtenidas a partir de huevos colectados en tres colonias del Distrito Central, Departamento de Francisco Morazán. Los huevos recuperados en el campo se rehidrataron en el laboratorio (área de trabajo) para inducir su eclosión y criar las larvas que se obtuvieran de ellos hasta completar su ciclo reproductivo como adultos para producir así la generación F1 (población de estudio) utilizada para los ensayos [Llinás G.

et al., 2010]. Se colectaron y criaron además larvas de *Aedes aegypti* con fines ilustrativos y de documentación de la presencia de esta especie en los sitios de colecta, clasificándolas una vez que alcanzaron su estadio adulto.

### **3.6 Selección de sitios de muestreo**

#### **3.6.1 Tipo de muestreo**

Muestreo por selección intencionada o por conveniencia.

Se realizó un pre-muestreo que consistió en una colecta de huevos y larvas de *Aedes aegypti* en los sitios seleccionados, en un periodo de dos semanas con el objeto de estandarizar las pruebas. En el pre-muestreo se colectaron todos los huevos que se obtuvieran de 10 ovitrampas (dos ovitrampas por vivienda en cinco viviendas) y todas las larvas de *Aedes aegypti* que se encontraran en los criaderos encontrados en los sitios seleccionados. Los huevos y las larvas obtenidas fueron criados y sometidos a un ensayo de estandarización con la concentración diagnóstica de temefós.

Una vez realizada la prueba de estandarización se colectaron huevos para formar una población primaria, que constituyó la población parental (P0), la cual procedió de localidades/casas que produjeron huevos viables en cantidad y calidad, que al eclosionar fueran capaces de generar una segunda población, la generación F1 (P1). Los huevos se colectaron mediante ovitrampas colocadas en las viviendas seleccionadas en el muestreo. Los huevos obtenidos se llevaron al laboratorio para su eclosión, tras lo cual, se criaron las larvas hasta su estado adulto. Los adultos resultantes se alimentaron para lograr que las hembras depositaran huevos que servirían para establecer la generación F1, sobre la



cual se realizaron los bioensayos. Las larvas F1 que se utilizaron en los bioensayos fueron de una misma cohorte para asegurar que tuvieran un tamaño uniforme y se encontraran en un estadio de desarrollo comparable. Para asegurarse que las larvas eran de una misma cohorte, se verificó el tiempo de eclosión de los huevos cada día en un ciclo de doce horas por lo menos.

### 3.6.2 Sitios de colecta

Las muestras fueron obtenidas en las colonias Manchén, Villanueva y Kennedy ubicadas en el Distrito Central, Departamento de Francisco Morazán, las cuales han sido abatizadas por las autoridades de la Secretaría de Salud, y presentan casos positivos tanto de dengue clásico como de dengue hemorrágico. La información sobre los casos reportados en estas colonias, fue proporcionada por otro proyecto llevado a cabo por investigadores de la Escuela de Microbiología de la UNAH, y que sirvió para seleccionar las cuadras a muestrear en dichas colonias. Se seleccionaron 10 casas en la colonia Villa nueva y 10 casas en las colonias Manchen y Kennedy. Las casas seleccionadas podían o no corresponder con casas positivas para personas que tuvieran o hubieran tenido recientemente miembros enfermos con dengue. Además, se incluyeron viviendas con sospecha de infecciones asintomáticas, con el fin de asegurar una mayor precisión tanto de los sitios de colecta como del tiempo de transmisión del virus. Después de seleccionar una casa en base a este criterio, se incluyeron nueve (9) casas más que se encontraran en un radio de 100 metros alrededor de la primera. En aquellos casos en que la casa estaba vacía, no se encontraron personas mayores de edad o las personas presentes no otorgaron su consentimiento para colocar ovitrampas en su hogar, se seleccionaron las casas inmediatas en un radio de 100 m.

### 3.6.3 Solicitud de acceso a las viviendas

Se solicito el permiso de acceso a las viviendas a los propietarios de estas en las cuadras seleccionadas para el muestreo, después de haberse identificado y de haber explicado las razones del estudio y sus implicaciones. Si el acceso se concedía, se procedió como sigue:

1. Se asigno un número secuencial a la vivienda, anotando al lado del mismo el número de la casa (cuando lo tenía), características como: color de la casa, casa de una o dos plantas, con o sin portón, etc., de modo de identificar la misma en la siguiente visita. Estos datos se anotaron en un libro al que solo el investigador tenía acceso sin que esta información pudiera ser identificada por personas ajenas al estudio, asegurando así la confidencialidad de la información. Este número consistió en un número romano precedido por una letra “V” y siguió un orden secuencial sin importar la localidad a la que pertenecía la casa, lo que quiere decir que la primera vivienda seleccionada tendría el número VI, la segunda VII y así sucesivamente;
2. Se colocaron dos ovitrampas en la vivienda y se colectaron larvas en los posibles criaderos presentes en dicha vivienda;
3. Se visito nuevamente la vivienda después de 5 o 6 días durante las siguientes tres semanas (o más) para revisar las ovitrampas. Si el acceso era negado, se procedía a las casas contiguas. No se pidió un consentimiento firmado, ya que el estudio no implicaba la toma de muestras en sujetos humanos.

### 3.7 Tamaño de la muestra

De la población parental (P0) colectada en el campo se esperaba que un 50% sobreviviera hasta el estado adulto y que al menos se pudiera obtener de 50 a 100 huevos por cada hembra adulta criada en el insectario. De estos huevos se esperaba que el 50%

eclosionaran y produjeran larvas que alcanzasen el 3er o 4to estadio para poder ser utilizadas en los bioensayos (F1). En cuanto a la cepa de referencia Rockefeller, se esperaba un porcentaje de eclosión de huevos del 75% y un 50% de supervivencia hasta el estado adulto. Así mismo, se esperaba obtener de 50 a 100 huevos por cada hembra adulta de los cuales sobrevivieran al menos el 50%.

La muestra consistió de 240 larvas (20 larvas en 12 recipientes descartables) de 3er o 4to estadio, de tamaño uniforme para cada bioensayo en el que se ensayaba una concentración del insecticida. Se ensayaron cinco concentraciones diferentes y se realizaron seis repeticiones por concentración, para un total de 7,200 larvas a ensayar (1,200 larvas en cinco concentraciones=7,200 larvas en seis réplicas por las cinco concentraciones). Esto estuvo acorde con los procedimientos de la OMS y con el protocolo de la Red Latinoamericana de control de vectores (RELCOV), en los que 20 ó 25 larvas de 3er o 4to estadio son sometidas a una concentración específica del insecticida por cada ensayo, tras lo cual, se realizan cuatro replicas (o más) para cada concentración [Bisset et al., 2005; World Health Organization, 1981].

### **3.8 Cepa de referencia**

Para el presente estudio, se utilizó la siguiente cepa de referencia:

Cepa Rockefeller: cepa de referencia de *Aedes aegypti*, susceptible a insecticidas; origen: El Caribe (década de 1930); mantenida en el laboratorio del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de San Juan, Puerto Rico [Rodríguez et al., 2007].

Presentación utilizada: Huevos deshidratados.

La cepa fue adquirida a través del Laboratorio de Entomología (laboratorio de investigación) de la Escuela de Ciencias Agronómicas, Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar, Universidad Nacional de Costa Rica (UNA), y estuvo disponible conforme a las estipulaciones técnicas y ciñéndose a los tiempos programados para el estudio.

### **3.9 Insecticida a utilizar**

#### 3.9.1 Datos de identificación

Datos Según Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina [(RAP-AL), 2009]:

- (a) Nombre químico de acuerdo a la nomenclatura IUPAC: 0,0,0'0',-Tetrametil 0,0'-tio – di-p-fenilenoDifosforotioato
- (b) Clase: Organofosfatos (OP); Subclase: Fosforotioatos
- (c) No. Cas: 3383-96-8
- (d) Nombre comercial: Temefós/Temephos/Abate
- (e) Grado técnico (%): 98% de pureza, 2% materia inerte
- (f) Presentación: Concentrado emulsionable

El insecticida fue adquirido por separado de la cepa, mediante una institución o casa comercial que lo proveyó en tiempo y orden. Se utilizó temefós grado técnico de 97.5% para preparar una solución madre (stock) a partir de la cual se obtendrían cinco

concentraciones para los bioensayos (sección: 3.9.2). Se utilizó alcohol etílico absoluto como disolvente para la solución stock.

### 3.9.2 Concentraciones del insecticida

Se prepararon cinco concentraciones del insecticida a partir de la formulación comercial adquirida. Las concentraciones a ensayar fueron las recomendadas por Biber y colaboradores (2006), con excepción de la última concentración planteada en dicho trabajo (0.001mg/l). Las concentraciones fueron las siguientes: (1) 0.012mg/l; (2) 0.024mg/l; (3) 0.006mg/l; (4) 0.003 mg/l; y (5) 0.0015mg/l. La primera concentración corresponde a la concentración diagnóstica propuesta por la OMS en 1992, la segunda concentración corresponde al doble de la concentración diagnóstica (procedimiento usado para determinar la concentración más alta que se necesita en la preparación de una serie de soluciones) [Neal, 1976], y las tres siguientes corresponden a concentraciones más bajas, siendo cada una el doble de la siguiente [Biber et al., 2006]. En la preparación de las distintas concentraciones del insecticida, la concentración más diluida se preparará primero [World Health Organization, 1981].

### 3.10 Condiciones del área de trabajo

Tanto la cría de los mosquitos como los bioensayos se realizaron en un cubículo dentro del bioterio de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Ciudad Universitaria, Tegucigalpa. El cubículo cuenta con espacio suficiente, dos mesas de trabajo, agua potable (de pozo), iluminación (candelas de neón), toma de suministro eléctrico (110 voltios) y ventilación, condiciones adecuadas para la realización del estudio. Se utilizó un

cable de extensión para conectar una regleta (protector de picos de voltaje) en el cual se conectaron una lámpara de escritorio con bombillo de luz, un ventilador (para refrescar el ambiente en momentos de mucho calor) y un riel de madera con bombillos de 40 watts utilizado para simular luz de día al atardecer. Se trabajó en dos mesas grandes en donde se colocaron las bandejas con larvas y los baldes con mosquitos adultos en extremos opuestos (según el caso). La cría de los mosquitos se realizó a temperatura ambiente. En caso de que la temperatura ambiente bajara de 23°C, se colocarían los recipientes conteniendo las larvas bajo bombillos de 60 watts para brindarles calor y minimizar la posibilidad de muerte.

Para la preparación de las concentraciones del larvicida a ensayar, se utilizó una campana de gases ubicada en el Laboratorio MEIZ, 4to. piso, Escuela de Microbiología, edificio de Ciencias Biológicas (CB). La clasificación de las larvas y los adultos de mosquito se realizó con un estereomicroscopio marca ZEISS, modelo STEMI DV4 ubicado dentro del mismo laboratorio.

### 3.10.1 Monitoreo de la temperatura y la humedad relativa

La temperatura y la humedad fueron monitoreadas y registradas dos veces al día con un termo-higrómetro digital Timex modelo TX5170 con capacidad de registro de 0 a 50 °C para interiores y entre -20 a 50 °C para exteriores, y entre 20 y 90% de humedad con un desempeño ideal de entre 40 a 70% [Palomino S et al., 2007].

### 3.10.2 Control del fotoperiodo

El fotoperiodo siguió un modelo de 12:12 horas (luz/oscuridad) y fue controlado con un temporizador (al inicio del estudio) conectado a un riel de madera con tres bombillos de 40 watts. Este temporizador estaba programado para apagar los bombillos tras un periodo de luz de 12 horas, asegurando 12 horas restantes de oscuridad. Durante una parte del estudio se tuvo que encender y apagar las luces manualmente debido a un mal funcionamiento del dispositivo antes mencionado.

## 3.11 Colecta de muestras

### 3.11.1 Uso de ovitrampas

Se colocaron un total de 60 ovitrampas (2 por cada vivienda) en un total de 30 viviendas (10 casas por colonia); 20 ovitrampas se colocaron en la colonia El Manchén, 20 en la colonia Villanueva y 20 en la Kennedy. Las ovitrampas fueron ubicadas en el exterior de las casas (en patios, solares, alrededores), en sitios con sombra, y ocultas de niños y animales. En el caso de encontrarse durante una inspección, una ovitrampa sin agua, removida de su sitio o volteada, esta era reubicada, se llenaba nuevamente y no se contaba para esa visita. Todas las ovitrampas se colocaron a una altura de 0 a 0.60m del nivel del suelo. Si una ovitrampa era colocada en un sitio en donde estuviera expuesta al agua de lluvia, se le perforarían agujeros unos centímetros arriba del nivel del agua, a modo de desagüe. Se revisaron cada seis días, el día anterior al día en que fueron puestas durante la semana. Se uso papel absorbente comercial o papel filtro como sustrato para la ovipostura de los huevos.

Las trampas fueron ubicadas detrás de macetas, barriles, pilas (a 1.00 ó 1.50 m de estas últimas) o cualquier sitio sombreado. Se colocó una etiqueta a cada ovitrampa conteniendo el nombre de la localidad muestreada, el número de la casa muestreada, el número de ovitrampa, la fecha en que fue colocada y la fecha en la que fue retirada.

### 3.11.2 Modelo de ovitrampas

Las ovitrampas consistieron de un recipiente de plástico color negro, de 12.4 cm de alto, 12 cm de diámetro en su parte superior y 9 cm de diámetro en su parte inferior. El volumen total del recipiente fue de 800 ml; la ovitrampa era llenada con agua de la llave hasta un volumen de 300 ml. Se colocó papel absorbente o papel filtro en el interior del recipiente en vez de una paleta de madera como sustrato para la oviposición de los huevos. Esta sustitución constituye una modificación aceptada del modelo estándar (Figura 16: Anexo A).

### 3.11.3 Colecta de larvas para prueba de estandarización

Se colectaron larvas de todos los recipientes ubicados en el exterior de las casas, incluyendo bases de macetas, pilas, barriles, latas, llantas, bebederos de animales, etc.

Las larvas fueron extraídas de los recipientes utilizando un succionador de plástico con un bulbo de goma o con un cucharón sopero y colocadas en botellas plásticas de refresco tapadas con cedazo pequeño o gaza conteniendo agua del recipiente del que fue tomada la larva, tras lo cual fueron transportadas al sitio de trabajo para realizar la prueba de estandarización.



Siguiendo estos criterios, se colectaron todas las larvas encontradas en los recipientes inspeccionados, y la confirmación de la especie de *Aedes* se realizó posteriormente en el laboratorio. Larvas pertenecientes a otras especies colectadas durante los muestreos fueron descartadas en el laboratorio tras su clasificación taxonómica.

#### 3.11.4 Clasificación de larvas y adultos en el laboratorio

La confirmación de la especie de *Aedes* se realizó en el laboratorio MEIZ utilizando un estéreo microscopio y claves taxonómicas para clasificación de larvas y adultos de mosquitos culícidos. Se sometió la clasificación inicial a un control de calidad mediante la confirmación de la misma por parte de un especialista del laboratorio de Limnología de la Escuela de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras.

#### 3.12 Claves taxonómicas a utilizar

Para la clasificación taxonómica de las muestras de larvas colectadas, se utilizaron dos claves taxonómicas complementarias: 1.-Para larvas: “Clave ilustrada para la clasificación de larvas de mosquitos de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina”, publicada por la Fundación Mundo Sano, Ciudad de Buenos Aires, República Argentina [Rossi and Almirón, 2004] (Anexo B).2.- Para Adultos: “Pictorial Keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with Dengue Virus Transmission” [Rueda, 2004].

### 3.13 Acondicionamiento del insectario

El insectario consistió en una sección del cubículo en la que se instalaron de seis a diez baldes plásticos, acondicionados como jaulas, los cuales fueron utilizados para la cría de mosquitos adultos. Cada uno de los baldes tenía en el centro un agujero de 16 cm de diámetro al cual se unía una manga de tela de manta mediante remaches de aluminio de 5/32" (4mm), la cual permitía la manipulación de los mosquitos, así como de los recipientes o materiales necesarios para la cría de estos. Los baldes plásticos tenían la cubierta o tapa superior perforada y cubierta con una pieza de red de fibra de vidrio para evitar el escape de los mosquitos y permitir la visualización de los mismos. (Figura 17: Anexo C).

#### 3.13.1 Recipientes para la cría de larvas

Se utilizaron tres tipos de recipientes plásticos para la cría de las larvas tanto de la cepa de referencia Rockefeller, como de las cepas de campo: transparentes pequeños (25.5 x 18.5 x 6.9 cm); blanco opaco pequeño (27.5 x 16.8 x 9.2 cm); y blanco opaco mediano (32.3 x 21.6 x 11 cm). El tamaño de los recipientes proporciono el suficiente espacio vital incluyendo la suficiente cantidad de agua por bandeja para asegurar el buen desarrollo de las larvas. *Aedes aegypti* es una especie de mosquito que responde bien a la crianza en espacios pequeños, por lo que en una pana plástica pueden criarse una gran cantidad de larvas simultáneamente. El número de recipientes que se utilizaron fue de tres (3) recipientes transparentes pequeños, un (1) recipiente blanco opaco pequeño y cinco (5) recipientes blancos opacos medianos.

### 3.13.2 Alimentación de las larvas

Las larvas fueron alimentadas con hígado de res liofilizado libre de hongos, bacterias y virus, entre dos a tres veces por semana. Se obtuvieron comercialmente tres frascos de una libra (454 g/frasco) del producto mencionado para asegurar su disponibilidad durante el estudio [Yee et al., 2004]. Este producto se obtuvo comercialmente mediante pedido a Symmag, suministros Industriales, representante para Honduras de la casa comercial MP Biomedicals, LLC.

### 3.13.3 Alimentación de los mosquitos adultos

Estos mosquitos fueron alimentados con algodón o gaza embebida en una solución azucarada del 5 al 15% preparada a partir de azúcar morena o bien miel de abeja, durante los dos primeros días tras su desarrollo como adultos, tras lo cual (después del tercer día) se alimentaron con sangre de animal. Se utilizó sangre de animal (vaca o cerdo preferiblemente), preparada dentro de tripa de res o cerdo en forma de embutido, preparada con heparina o EDTA como anticoagulante y calentada a una temperatura de 37°C(en baño maría según se requiera) para la alimentación de los mosquitos adultos (Figura 18: Anexo D).

### 3.13.4 Recipientes para la puesta de huevos

Se colocaron platos hondos de foam con agua dentro de los baldes plásticos que contenían a los mosquitos adultos para lograr la ovipostura de las hembras durante el tiempo que correspondía a este ciclo. Los platos estaban recubiertos con papel filtro, el mismo que se

utiliza para colar café en percoladora o (en caso de faltar el anterior) papel absorbente con un lado rugoso a manera de sustrato para el depósito de los huevos.

Los huevos depositados sobre el papel filtro que eran retirados de los baldes de cría, se colocaban sobre los mismos platos que los contenían y se guardaban dentro de una caja grande de foam de 58.5 x 42.5 x 30.5 cm para que se secaran en un periodo de entre 3 a 4 días. Posteriormente, el papel filtro seco junto con los huevos se colocaba en uno de los recipientes plásticos con agua para su rehidratación e inducir así la eclosión y emergencia de las larvas F1 que se utilizarían para las pruebas con larvicida [Singh and Morre, 1985].

### **3.14 Realización de bioensayos**

#### 3.14.1 Procedimiento de los bioensayos

Los bioensayos se realizaron a temperatura ambiente siguiendo las instrucciones contempladas en el “Protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas de mosquitos de la especie *Aedes aegypti*” establecida en una reunión de la Red Latinoamericana para el Control de vectores (RELCOV) llevada a cabo en la ciudad de Iguazú, provincia de Misiones, Argentina en el año 2004 [Bisset et al., 2005]. El procedimiento seguido fue el siguiente:

#### Procedimiento:

- (a) Para los bioensayos se utilizaron larvas de 3er estadio tardío o 4to estadio temprano de 4mm de longitud aproximadamente. Se esperaba hasta que las larvas tuvieran aproximadamente cuatro días de haber eclosionado, aunque esto podía variar debido a las condiciones de temperatura imperantes en el sitio de trabajo.

- (b) El insecticida utilizado fue Temefós(O,O,O´O´-tetrametil – O,O´-tiodi p-fenilendifosforotionato) conocido comúnmente como “Abate” grado técnico 97.5%.
- (c) Se prepararon 12 vasos descartables (vasos plásticos) con capacidad para 50 ml, conteniendo 25 ml de agua potable previamente declorada, y entre 20 y 25 larvas de 3er o 4to estadio.
- (d) Se aseguro de colocar entre 20 y 25 larvas de 3er o 4to estadio en cada vaso.
- (e) Se prepararon 12 recipientes con capacidad de entre 400 y 500 ml, colocando en estos, 224 ml de agua declorada. La forma del recipiente, debía permitir que el agua alcanzara una altura no menor a 2,5 cm.
- (f) Los recipientes se etiquetaron como “control” y “tratados”, teniendo los tratados el nombre del producto en evaluación (temefós), su concentración y número de identificación secuencial (la numeración secuencial siguió el orden: 1,2,3...y así sucesivamente) para evitar confundir controles con tratados.
- (g) Para una prueba completa se prepararon cuatro recipientes como controles y ocho como tratados.
- (h) Se utilizo como concentración discriminante 0.012 mg/ml (0.012 ppm)de temefós (internacionalmente reconocida).
- (i) Con una pipeta se introdujo por debajo de la superficie del agua, 1 ml de alcohol etílico en los recipientes control y 1 ml de solución alcohólica de temefós en los recipientes tratados, la cual represento una concentración final de 0.012 mg/ml correspondiente a la concentración discriminante en los recipientes tratados. Finalizada la introducción del alcohol y el alcohol + temefós, se agitaba el contenido de los recipientes con una varilla o cuchara durante 30 segundos.

- (j) Después de un periodo de reposo de entre 15 a 30 minutos de preparadas las soluciones para el ensayo, se transferían las larvas de mosquitos que estaban en los 12 recipientes pequeños juntamente con los 25 ml de agua, a los vasos con 224 ml de agua, siendo cuatro recipientes para control y ocho recipientes para tratados.
- (k) Se monitorearon las condiciones del área de trabajo, de tal manera que la temperatura no bajara de 20 °C (idealmente  $28\pm 2$  °C), y el fotoperiodo se mantuviera en 12:12 horas (luz/oscuridad). Si no se cuenta con una cámara climatizada, las larvas pueden criarse a temperatura ambiente procurando calentar el ambiente inmediato de las larvas (en la mesa de trabajo o estantería donde estén los recipientes de cría) con luz artificial (bombillos comunes) o enfriar el lugar con ventilador. La humedad debe monitorearse con un termo-higrómetro análogo o digital, procurando que no baje de 60% (ideal entre 70-80%).
- (l) La mortalidad fue registrada 24 horas después de la exposición de las larvas a las distintas concentraciones del insecticida a ensayar (incluida la concentración diagnóstica o discriminante).
- (m) Se consideraron muertas a aquellas larvas que no presentaban movimiento normal, eran incapaces de moverse después de agitar el recipiente que las contenía, o no respondían al ser pinchadas en su sifón o región cervical con una aguja.
- (n) Se consideraban moribundas a aquellas larvas incapaces de llegar a la superficie del recipiente para respirar (dentro de un periodo de tiempo razonable), o eran incapaces de reaccionar normalmente a la perturbación del agua [World Health Organization, 1981].
- (o) Las larvas moribundas se contabilizaban como muertas.

- (p) Se registraron y descartaron a todas aquellas larvas que alcanzaron el estadio de pupa durante la realización de los bioensayos.
- (q) Si en los controles más del 10% de las larvas alcanzaban el estadio de pupa o se registraba más del 20% de mortalidad durante el curso de cada experimento, el bioensayo era considerado insatisfactorio y se repetía.
- (r) Si el ensayo era aceptable, se descontaba el número de pupas encontradas en los tratados y controles para realizar los cálculos de porcentaje de mortalidad según la fórmula siguiente:

Cálculo del porcentaje de mortalidad:

$$\frac{\text{No. de larvas muertas}}{\text{No. larvas expuestas}} \times 100$$

- (s) Si la mortalidad de los controles se encontraba entre 5% y 20%, el porcentaje de mortalidad de larvas tratadas se corregía mediante la siguiente fórmula:

Formula de Abbott:

$$\frac{\% \text{ de mortalidad de tratados} - \% \text{ mortalidad de controles}}{100 - \% \text{ mortalidad de controles}} \times 100$$

- (t) Los porcentajes de mortalidad obtenidos en los bioensayos se extrapolaron en una gráfica que representa el logaritmo de la concentración del insecticida ensayado frente al porcentaje de mortalidad que produce.

- (u) Se prepararon cinco concentraciones distintas de temefós y se realizaron seis réplicas por concentración, para poder evaluar el grado de susceptibilidad o resistencia al insecticida ensayado.
- (v) La preparación de las concentraciones de temefós fueron tales que al menos cuatro de ellas causaron una mortalidad entre un 2% y un 98%.

### 3.14.2 Soluciones de temefós técnico en etanol absoluto

Como referencia y para la cepa susceptible de mosquitos, las soluciones de temefós técnico en etanol absoluto se prepararon por dilución de la solución stock hasta obtener la concentración discriminante de 0.012 mg/ml. En el caso de la población de mosquitos cuyas larvas se consideraba eran resistentes al temefós por ensayo de concentración discriminante, se incluyeron concentraciones de temefós menores a 0.012 mg/ml y una solución de 0.024 mg/ml (que representa el doble de la misma).

### 3.14.3 Fórmula para las diluciones

Cuando se hacen diluciones a partir de una solución comercial concentrada (stock), se pueden emplear varias fórmulas que faciliten la preparación de concentraciones menores a la solución stock. Para preparar las cinco diluciones de la formulación comercial de temefós, se utilizó la siguiente fórmula:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Donde:

$C_1$  = Concentración inicial



$V_1 =$  Volumen inicial

$C_2 =$  Concentración final

$V_2 =$  Volumen final

Esta fórmula se lee como sigue: El producto de la concentración inicial o concentración conocida ( $C_1$ ) de un soluto contenido en un volumen inicial ( $V_1$ ) de solvente, es igual al producto de la concentración final o esperada del soluto ( $C_2$ ) por el volumen final del solvente ( $V_2$ ). Esta fórmula es una representación matemática de la ley de la conservación de la materia.

Si lo que se desea preparar son diluciones seriadas en ppm (partes por millón) a partir de una solución stock concentrada, se debe utilizar la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{cantidad en ppm}}{1 \text{ millón}} \times \frac{\text{volumen en mililitros}}{? \text{ peso en gramos}}$$

Donde:

Cantidad en ppm = cantidad en ppm que se desea preparar

Volumen en mililitros = cantidad en mililitros de solución que se desea

1 millón = un millón de partes de solución

? peso en gramos = gramos de solución stock (en este caso 0.975)

Esta fórmula se aplicará en caso que se necesiten preparar concentraciones seriadas a partir de la solución comercial adquirida, aplicando un factor de reducción conocido. Este

procedimiento es muy usado en la preparación de diluciones de pesticidas y resulta más fácil de aplicar que la preparación de concentraciones fijas. En el presente estudio se prefirió aplicar la primera fórmula (a pesar de contar con un factor de dilución conocido).

#### 3.14.4 Criterio para establecer resistencia al temefós por concentración discriminante

La concentración discriminante o diagnóstica, es la concentración del insecticida que normalmente produce la muerte al 99% de los insectos susceptibles. Normalmente se utiliza 0.012 mg/L para temefós en larvas de la especie *Aedes aegypti*. Si al concluir el efecto larvicida en al menos cinco de ocho réplicas (recomendadas por el protocolo de RELCOV) de tratamiento con concentración discriminante de temefós sobre una población en evaluación se determina una mortalidad corregida de larvas igual o mayor al 5% se considerará que la población de mosquitos en estudio ya ha desarrollado algún grado de resistencia al larvicida.

#### 3.14.5 Determinación de DL50 del larvicida

Cuando el ensayo de concentración discriminante antes descrito, indica que la población de mosquitos en evaluación ha desarrollado algún grado de resistencia, es recomendable determinar la dosis letal 50% del temefós (producto técnico) sobre larvas de la población de mosquitos evaluada y sobre larvas de la cepa susceptible de referencia, para determinar el factor de resistencia (FR).

El FR se refiere a cuantas veces más concentración de temefós se necesita para matar el 50% de la población de larvas resistentes respecto a la que se requiere para matar el 50% de la población de larvas susceptibles.

El FR se obtiene de la siguiente ecuación:

$$FR = DL_{50} R / DL_{50} S$$

Donde:

$DL_{50} R$  = Concentración letal 50% de la cepa resistente (evaluada)

$DL_{50} S$  = Concentración letal 50% de la cepa susceptible

Se calculará el factor de resistencia al temefós para la  $DL_{50}$  ( $FR_{50}$ ) como la razón entre la DL correspondiente de la cepa evaluada (de campo) y el valor de esa DL en la cepa susceptible de referencia [Bisset et al., 2009].

#### 3.14.6 Criterio de exclusión de larvas para los bioensayos

Se descartaron aquellas larvas que presentaron algún tipo de anomalía, o presentaron parásitos sobre la superficie del cuerpo [World Health Organization, 1981].

#### 3.14.7 Interpretación de resultados

Los resultados de los ensayos de susceptibilidad por el método de susceptibilidad o resistencia de larvas de mosquitos a larvicidas, se expresan como el porcentaje de mortalidad de larvas de mosquitos expuestas después de 24 horas. Cuando se usa la dosis diagnóstica o discriminante, la interpretación de resultados se realiza considerando los rangos sugeridos por la OMS tanto en larvas como en mosquitos adultos:

- De 98 a 100% de mortalidad indica susceptibilidad
- De 80 a 97% de mortalidad sugiere la posibilidad de resistencia a confirmar

- <80% de mortalidad sugiere resistencia

Este fue el criterio que siguió el análisis de resultados en el presente estudio para determinar la respuesta de la población ensayada al temefós.

### **3.15 Registro de datos**

#### **3.15.1 Bitácora de campo**

Consistió de un libro de registros de campo, en donde se anotaron: los datos pertinentes a cada casa inspeccionada (ubicación, número de casa, propietario(a), número de visitas hechas, posición de las ovitrampas, estado de las ovitrampas, número de muestras, próxima visita, observaciones). Estos datos fueron registrados por el investigador y en ciertos casos por un acompañante capacitado. Se elaboró además una ficha de registro por visita la cual resumía los datos antes mencionados y servía como fuente de respaldo de los datos recogidos en el campo en caso de extraviar la libreta de campo. Las fichas de registro fueron mantenidas en un archivo fuera del laboratorio (insectario) de trabajo.

#### **3.15.2 Bitácora de laboratorio**

Se registraron en detalle los procedimientos y las condiciones bajo las cuales se llevaron a cabo los bioensayos. Estos datos incluían: la temperatura ambiente (dos veces al día), humedad (dos veces al día), número de larvas y sus estadios, pupas por recipiente, etc. Durante los bioensayos se anotaron con cuidado la concentración en ensayo, total de larvas ensayadas, controles y tratados y los resultados de mortalidad y supervivencia de larvas después de 24 horas de tratamiento con cada concentración ensayada.

### 3.16 Consideraciones éticas y de bioseguridad

#### 3.16.1 Consideraciones éticas

El presente estudio no requirió de un documento de consentimiento informado ya que los sujetos de estudio no fueron seres humanos. Se solicitó a los propietarios de las viviendas a muestrear su consentimiento verbal para poder colocar las ovitrampas y colectar las larvas, tras una explicación detallada de los objetivos del estudio y de sus alcances potenciales. Las viviendas muestreadas fueron codificadas por el investigador principal del estudio, asegurando que los datos de identificación se mantuvieran en total confidencialidad, protegiendo a las personas en sus casas de cualquier inconveniente relacionado con la toma de muestras. En este estudio se realizaron bioensayos en laboratorio para determinar el grado de susceptibilidad de larvas de mosquito (*Aedes aegypti*) al larvicida organofosforado temefós.

#### 3.16.2 Consideraciones de bioseguridad

Se aplicaron las siguientes consideraciones de bioseguridad:

- (a) Las personas involucradas en la ejecución de los bioensayos (investigador principal y un asistente en algunos casos), conocían los peligros potenciales del producto a manipular (temefós grado técnico) y las medidas de bioseguridad correspondientes y pertinentes.
- (b) Solo el investigador principal del estudio o su asistente (en caso de ser necesario), tenían acceso a la manipulación del instrumental de laboratorio, equipo o material biológico disponible para la cría de los mosquitos y los bioensayos.

- (c) Las jaulas (baldes plásticos) en las que permanecían los mosquitos adultos, eran manipuladas únicamente por el investigador principal y su asistente.
- (d) Se colocaron dos rótulos fuera del cubículo en donde se realizaron los bioensayos, el cual indicaba que el acceso a esa área estaba restringido por razones de seguridad, ya sea que se estuvieran realizando o no pruebas en ese momento.
- (e) Al momento de utilizar reactivos químicos se trabajó en una campana de gases y se utilizó el equipo de protección personal pertinente.
- (f) Se utilizó gabacha manga larga dentro del insectario para evitar en caso de fuga, la picadura de los mosquitos sobre la piel del que manipulaba las jaulas.
- (g) Se tuvo el cuidado de no poner en contacto ningún material del insectario utilizado para la cría de larvas (jaulas, bandejas para larvas, coladores, vasos, etc.) con el insecticida químico a utilizar (para evitar mortalidad de las larvas por contacto).
- (h) Se realizó lavado de las manos con jabón neutral antes de manipular las larvas o los recipientes que las contenían, para evitar introducir elementos extraños y fuentes de contaminación para estas.
- (i) No se permitió el acceso de personas con síntomas de gripe o dengue al área de trabajo (insectario).
- (j) Se evito la fuga de mosquitos por las siguientes vías: (1) Las ventanas en el área de trabajo estaban cerradas con una malla de punto fino que evita la entrada y salida de insectos al interior del insectario; (2) Los baldes plásticos que contenían los mosquitos adultos (con capacidad de vuelo) estaban cubiertos con una doble malla de fibra de vidrio que permitía a su vez la visualización al interior de los baldes; (3) La manipulación de los baldes plásticos que contenían los mosquitos

adultos estuvo a cargo únicamente del investigador principal o un ayudante capacitado para dichas tareas.

- (k) En caso de fuga, se cerraba el cubículo de trabajo por 12 horas sin permitir el acceso de personas y se eliminaban los mosquitos que hubieran escapado fuera de las jaulas de cría mediante un insecticida de bajo impacto. Posteriormente se fumigaba completamente el insectario y se mantenía cerrado suspendiendo las actividades en el mismo por 24 horas, reduciendo así riesgos para el investigador y su ayudante como también asegurando la supervivencia de las larvas.

### **3.17 Análisis estadístico**

Los resultados de los bioensayos fueron sometidos a un análisis Probit por el método descrito por Finney (1971) utilizando un software computacional para obtener los valores de letalidad para cada concentración ensayada del insecticida [Rodríguez et al., 2002]. Se utilizó el programa para Windows Polo Plus versión 2.0 de LeOra Software para obtener los valores de  $DL_{50}$  y  $DL_{90}$  tanto de la cepa susceptible Rockefeller como de la población de campo en evaluación y los valores de  $FR_{50}$ . Se utilizó además la fórmula de Abbott para la corrección de los porcentajes de mortalidad cuando la mortalidad entre los controles estuvo entre 5% y 20% [Laurentino de Carvalho et al., 2004]. Se utilizó el siguiente criterio para evaluar el grado de resistencia al insecticida: alta resistencia si el valor de  $FR_{50}$  es mayor a 10; moderada si se encuentra entre 5 y 10; y susceptible si es menor de 5 [Bisset et al., 2009].

## CAPITULO 4. RESULTADOS

### 4.1 Periodo de estudio

El periodo de estudio comprendió un total de 28 semanas, desde el 6 de febrero hasta el 19 de agosto del año 2011. Se realizaron colectas de campo durante los meses de marzo, abril y mayo del mismo año. Posteriormente se desarrollo una cría en cautiverio tanto de larvas como de adultos de la especie *Aedes aegypti* para luego llevar a cabo una serie de bioensayos con cinco concentraciones del larvicida temefós (Abate).

### 4.2 Colecta de huevos

Se obtuvieron 25 ovitrampas positivas para huevos de *Aedes aegypti* durante los meses de colecta, lo que representa un 42% del total de trampas colocadas en las tres localidades de colecta (Cuadro 1.). Las trampas se mantuvieron por tres semanas en cada localidad y eran revisadas cada seis días (de acuerdo al protocolo utilizado en el estudio) en un día diferente de la semana para cada sitio de colecta (un viernes en Manchén; sábado en Villanueva; domingo en Kennedy por ejemplo), a partir del día en el que fueron colocadas las trampas en cada colonia. Las trampas con mayor número de huevos fueron las que se ubicaron a una distancia de entre 1.0y 1.5metrosde otros posibles criaderos, como pilas, barriles o llantas, y correspondieron con aquellas colocadas detrás de maceteros, en pasillos o en sitios sombreados protegidos de la lluvia en el exterior de las viviendas.



**Cuadro 1.** Colecta de campo (Periodo: marzo - mayo de 2011)  
Método de ovitrampas

Colonia/Localidad de colecta	Total trampas colocadas	Total trampas positivas	% Trampas positivas	Número total de huevos por localidad
Manchén	20	11	55	150
Villanueva	20	8	40	75
Kennedy	20	6	30	80
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>25</b>	<b>42</b>	<b>305</b>

#### 4.2.1 Colecta de larvas y adultos de mosquitos y otros dípteros

Durante las giras de campo se colectaron larvas y adultos de dos especies del género *Aedes* (*A. aegypti*; *A. albopictus*), una especie no determinada del género *Limatus* (*Limatus* sp.), una especie no determinada del género *Toxorhynchites* (*Toxorhynchites* sp.), y larvas de la familia Chironomidae. Todos los organismos colectados pertenecen al orden díptera. *Toxorhynchites* sp. se encontró únicamente en su estadio adulto. Dos larvas de *Limatus* sp. fueron colectadas en la colonia Villanueva en el mes de mayo. Larvas de Chironomidae se encontraron asociadas a ambas especies de *Aedes* en las colonias Villanueva y Kennedy. Estas colectas fueron ilustrativas, sirviendo como referencia de las especies de culícidos y otros dípteros encontradas en los sitios de colecta.

Para la determinación taxonómica de las especies colectadas se clasificaron las muestras mediante el uso de claves dicotómicas ilustradas en el laboratorio de la maestría en enfermedades infecciosas y zoonóticas de la Escuela de Microbiología de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras. La clasificación fue confirmada posteriormente por el laboratorio de Limnología de la Escuela de Biología, debido a su extensa experiencia en el estudio de invertebrados.

### **4.3 Cría en cautiverio de dos poblaciones de *Aedes aegypti***

#### 4.3.1 Eclosión de huevos

Se alcanzó un 100% de eclosión de los huevos colectados mediante ovitrampas, tras un periodo de secado de 3 días posteriores a la colecta. Durante el periodo de cría, el porcentaje de eclosión de huevos fue de aproximadamente 90% para la cepa de referencia Rockefeller y de 80% para la población de campo. El promedio en días para la eclosión tanto de los huevos de la cepa de referencia como de huevos de la población de campo fue de 3 días, con valores mínimos de 2 días y máximos de 5 días.

#### 4.3.2 Producción de larvas, pupas y adultos

Se logró una producción aproximada de 20,000 larvas (cepa Rockefeller más población de campo) en un periodo de cinco meses. Un 5% (aproximadamente) de las larvas criadas de ambas poblaciones murieron por causas no determinadas en el transcurso del estudio. Las larvas alcanzaban el estadio de pupa en un promedio de 8 días desde su primer estadio larval, con un rango de variación entre 7 y 10 días para ambas poblaciones. Una parte de las larvas tanto de la cepa Rockefeller como de la población de campo se utilizaron en los bioensayos con temefós (7,200 larvas en total), otra parte se utilizó para evaluar la respuesta de la cepa Rockefeller únicamente en bioensayos con las cinco concentraciones (2,400 larvas en total), y otra parte (1,920 larvas) se descartaron al repetirse un total de ocho bioensayos (240 larvas en cada bioensayo).

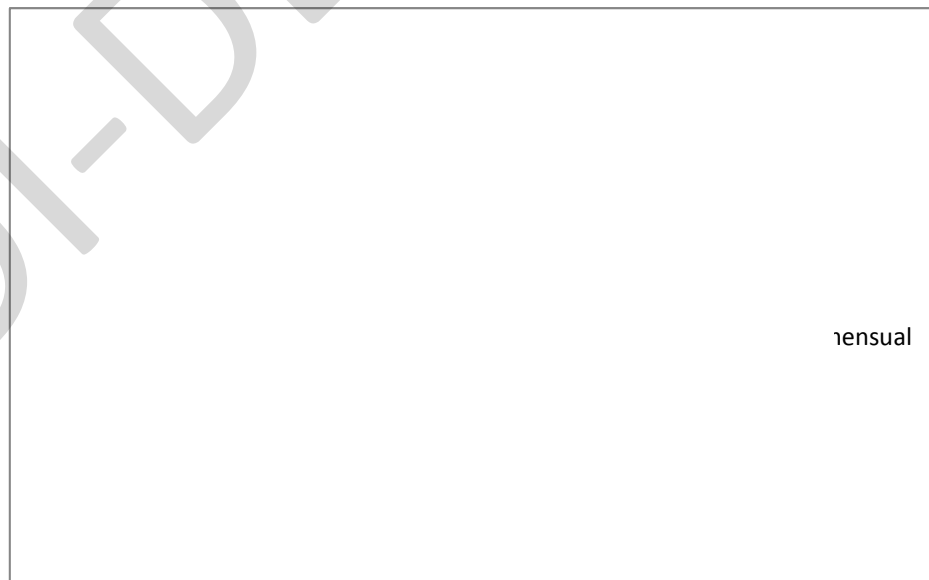
Se escogían al azar larvas de tercer estadio (tanto de la cepa Rockefeller como de la población de campo) para utilizarlas en los bioensayos, y se descartaban todas las que no se incluían en estos, debido a la falta de jaulas para contener los adultos resultantes.

Se extrajeron un total de 7,434 pupas en 99 días de trabajo efectivo, con un promedio de 75 pupas diarias. La proporción de pupas descartadas diariamente fue igualmente alta, particularmente en los meses de mayo, junio y julio, alcanzando hasta un 60% del total extraído por día.

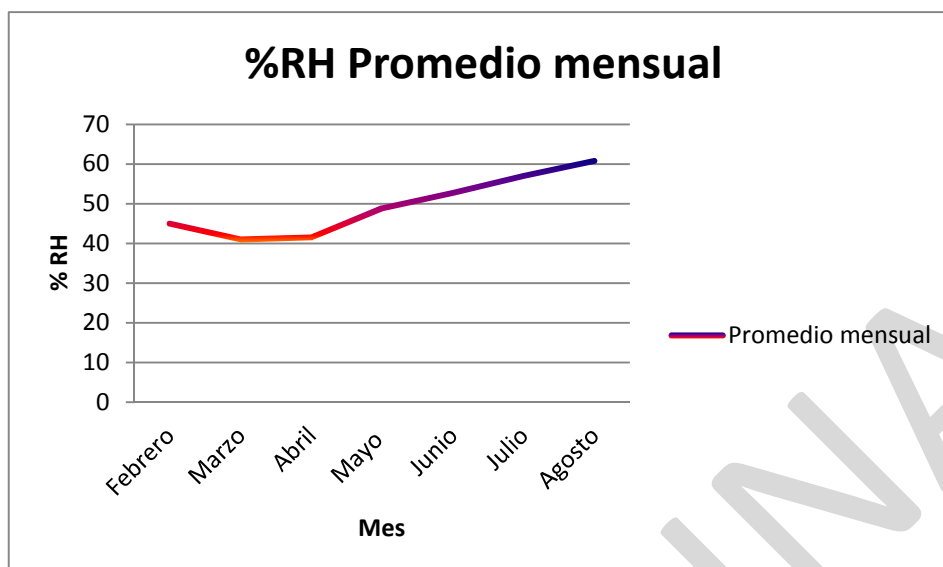
Las pupas que no eran descartadas se colocaban en vasos plásticos con capacidad de 50 ml dentro de cada una de las ocho jaulas construidas para contener los mosquitos adultos. El surgimiento de adultos se presentaba a los 2.5 días posteriores al surgimiento de las pupas. En cada jaula se mantenían entre 50 y 60 mosquitos adultos, con una relación aproximada entre hembras y machos de 3:1.

#### 4.3.3 Condiciones de temperatura, humedad y fotoperiodo

Los valores promedio de temperatura y humedad alcanzados durante el periodo de cría fueron de  $28 \pm 3$  °C y 50% de humedad relativa (Figuras 11 y 12 respectivamente). El fotoperiodo siguió un patrón de 12:12 (horas de luz y oscuridad).



dio.



**Figura 12.** Variación del porcentaje de humedad relativa durante el periodo de estudio.

#### 4.4 Preparación de soluciones de temefós (Abate)

Se pesaron 25.64 mg de temefós grado técnico (97.5%) para preparar una solución stock de 500 ppm ( $\mu\text{g/ml}$ ) en 50 ml de alcohol etílico absoluto (razón 1:2 insecticida; disolvente). Se tomaron cinco alícuotas de la solución stock para preparar cinco soluciones de trabajo: (1) 0.0015 ppm; (2) 0.003 ppm; (3) 0.006 ppm; (4) 0.012 ppm; (5) 0.024 ppm (Figura 11). Se utilizó alcohol etílico absoluto como agente diluyente en la preparación de todas las soluciones. Tanto la solución stock como las soluciones de trabajo se almacenaron bajo refrigeración a 4 °C para evitar su degradación. Se guardaron las soluciones en botes color ámbar estériles para un posterior uso.

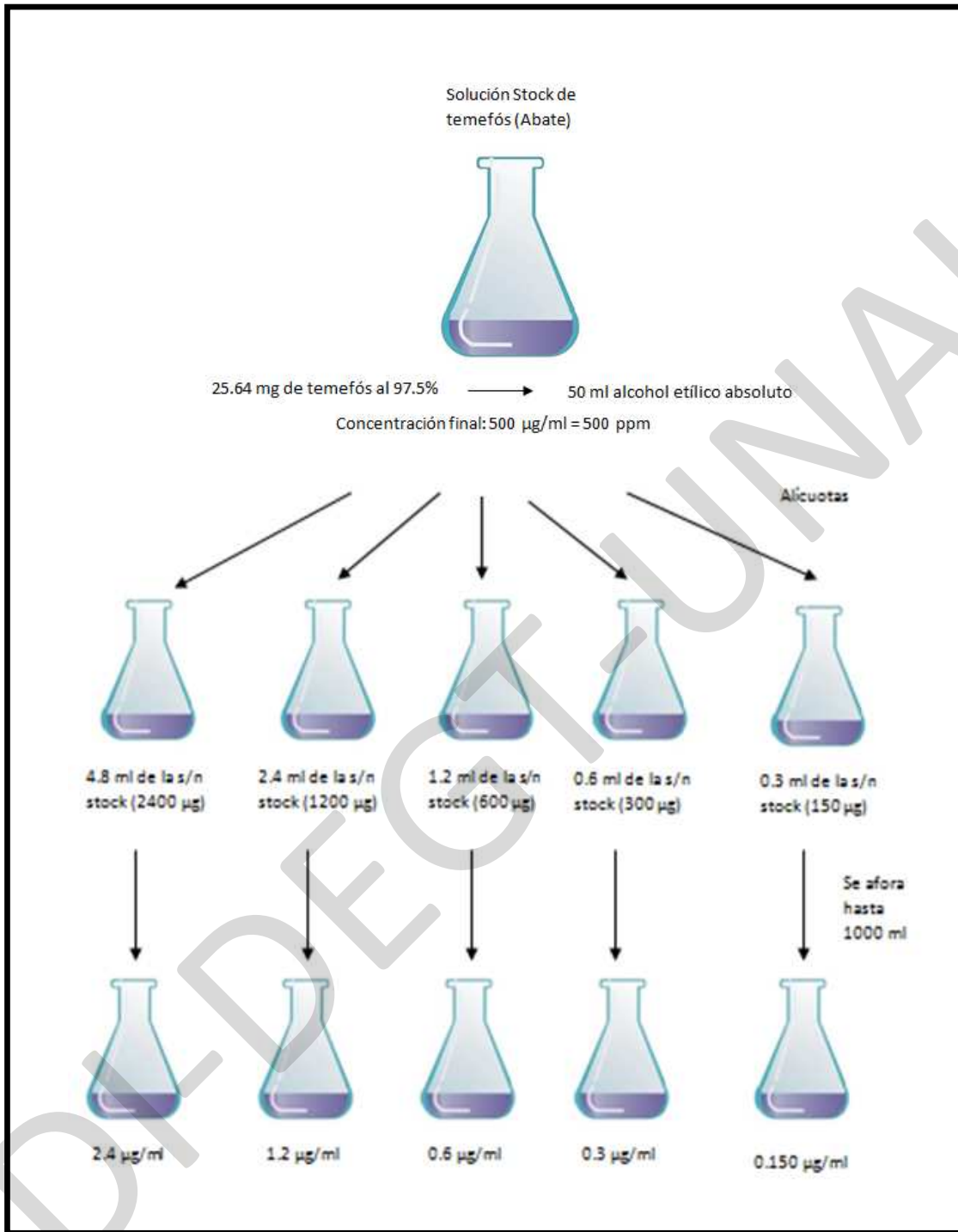
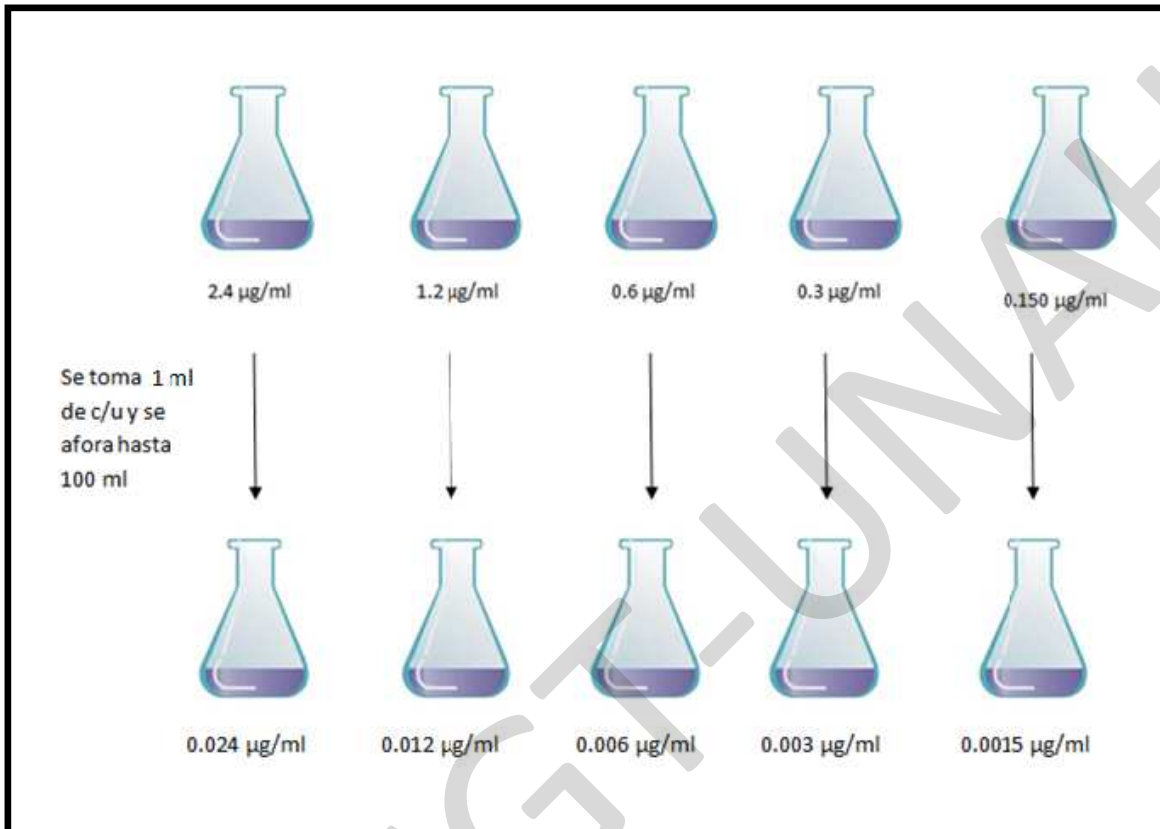


Figura 13. Esquema de preparación de soluciones de temefós (Abate).



**Figura 13.** (Continuación). Esquema de preparación de soluciones de temefós (Abate).

#### 4.5 Bioensayos con temefós

Se realizaron treinta bioensayos que consistieron en un bioensayo más cinco réplicas (en total seis) para cada concentración (solución de trabajo), en donde se sometieron ochenta larvas de 3er. estadio de la cepa de referencia Rockefeller y ciento sesenta larvas de 3er. estadio de la población de campo a cada dosis ensayada, siguiendo el modelo establecido en el protocolo de la Red Latinoamericana de Control de Vectores (RELCOV) y la Fundación Mundo Sano. Los porcentajes de mortalidad y supervivencia de larvas por bioensayo se muestran en el Cuadro 2.

Se realizaron además treinta pruebas (con larvas de la cepa Rockefeller únicamente) para establecer la  $DL_{50}$  de la cepa de referencia, misma que se necesitó para poder calcular el factor de resistencia de la población de campo. Se utilizaron larvas en recipientes con agua de clorada como controles. En estas pruebas con la cepa Rockefeller, se ensayaron las mismas concentraciones con el mismo número de réplicas que en los bioensayos con larvas de ambas poblaciones. De un total de 7,200 larvas tratadas siguiendo el protocolo de RELCOV, se registró un 40.42% de mortalidad entre las cinco concentraciones ensayadas, en contraste, en las pruebas de la cepa Rockefeller versus cada concentración se registró un 99% de mortalidad. Al momento de realizar los bioensayos se ensayó primero la solución menos concentrada (0.0015 ppm) y por último la más concentrada (0.024 ppm). La mortalidad de los tratados durante los bioensayos fue corregida posteriormente mediante la fórmula de Abbott:

$$\frac{\% \text{ mortalidad de tratados} - \% \text{ mortalidad de controles}}{100 - \% \text{ mortalidad de controles}} \times 100$$

Ejemplo:

$$\frac{42.8\% - 4\%}{100 - 4\%} \times 100 = 40.42 \text{ (dato en cuadro 2)}$$

#### 4.6 Análisis Probit

Se utilizó el programa Polo plus versión 2.0 para Windows (LeOra Software, Petaluma, CA) para calcular la DL<sub>50</sub> y DL<sub>90</sub> de la cepa de referencia Rockefeller y de la población de trabajo. La DL<sub>50</sub> calculada para la cepa Rockefeller fue de 0.011 ppm, lo cual concuerda con la dosis diagnóstica para dicha cepa descrita por la literatura [WHO, 1992]. La DL<sub>50</sub> de la población de campo por otro lado fue de 0.073 ppm, con un factor de resistencia (FR<sub>50</sub>) de 6.63 (>5, <10), el cual indica un incremento moderado en la tolerancia a temefós por parte de dicha población. Se calculó el factor de resistencia (FR<sub>50</sub>) como el cociente entre la DL<sub>50</sub> de la población de campo evaluada y la DL<sub>50</sub> de la cepa de referencia Rockefeller, siguiendo la siguiente ecuación:

$$FR = DL_{50} E / DL_{50} R$$

Donde:

DL<sub>50</sub> E = Dosis letal 50% de la población evaluada

DL<sub>50</sub> R = Dosis letal 50% de la cepa de referencia Rockefeller

La población evaluada muestra un grado moderado de resistencia a temefós, de acuerdo al criterio descrito por Bisset [Bisset et al., 2009]. Las pruebas de similitud y paralelismo con un P<0.05 realizadas para evaluar la relación entre los dos grupos indican que ambas poblaciones son diferentes (Figura 14). La hipótesis del estudio se rechaza, debido a que



las dos poblaciones se comportan de forma diferente al ser expuestas al estímulo. La  $DL_{50}$  y  $DL_{90}$  con sus límites de confianza para ambas poblaciones se muestran en el Cuadro 3.

**Cuadro 2.** Datos de mortalidad y supervivencia de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en bioensayos con cinco concentraciones de temefós (Abate) más réplicas.

Solución de temefós (ppm)	Larvas ensayadas	Larvas muertas	% Mortalidad	% Supervivencia
0.0015	240	0	0	100
0.0015	240	0	0	100
0.0015	240	0	0	100
0.0015	240	0	0	100
0.0015	240	0	0	100
0.0015	240	0	0	100
0.003	240	1	0.42	99.58
0.003	240	2	0.83	99.16
0.003	240	3	1.25	98.75
0.003	240	1	0.42	99.58
0.003	240	3	1.25	98.75
0.003	240	1	0.42	99.58
0.006	240	3	1.25	98.75
0.006	240	7	2.92	97.08
0.006	240	2	0.83	99.16
0.006	240	6	2.50	97.50
0.006	240	8	3.33	96.67
0.006	240	6	2.50	97.50
0.012	240	83	34.58	65.42
0.012	240	82	34.17	65.83
0.012	240	85	34.42	65.58
0.012	240	83	34.58	65.42
0.012	240	87	36.25	63.75
0.012	240	83	34.58	65.42
0.024	240	90	37.50	62.50
0.024	240	92	38.33	61.67
0.024	240	97	40.42	59.58
0.024	240	94	39.17	60.83
0.024	240	89	37.08	62.92
0.024	240	90	37.50	62.50
<b>Total:</b>	7,200	1,098		

Datos de mortalidad corregidos

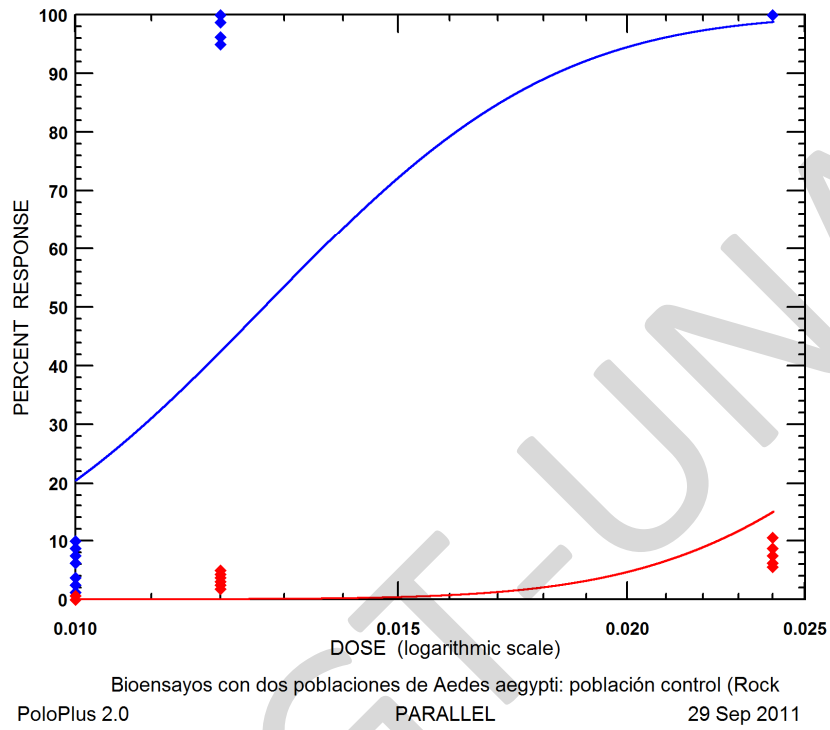
**Cuadro 3.** Intervalos de confianza (IC), DL50 y DL90, valores de la pendiente y factor de resistencia (FR50) para una población de *Aedes aegypti* procedente del Distrito Central, Francisco Morazán.

<b>Población</b>	<b>DL50 (ppm) IC</b>	<b>DL90 (ppm) IC</b>	<b>b</b>	<b>FR50</b>
Rockefeller	0.011 (0.011-0.011)	0.012 (0.011-0.012)	6.7	
Población de campo	0.073 (0.052-0.135)	0.203 (0.115-0.563)	2.8	6.63

IC, límites de confianza al 95%

b, pendiente de la recta

Se determinó que la línea base de susceptibilidad para la población estudiada, está en el orden de dosis de temefós mayores o iguales a 0.012 ppm, esto quiere decir que las concentraciones correspondientes a 0.003 ppm, y 0.006 ppm, produjeron una respuesta menor al 10% de mortalidad tanto en larvas de la cepa control como de la población de campo evaluada. La concentración de 0.0015 ppm no indujo mortalidad en ninguna de las poblaciones. La dosis 0.006 ppm, aunque indujo una baja mortalidad en las poblaciones ensayadas, puede considerarse como el límite inferior de la línea de susceptibilidad determinada hasta este momento para la población de campo. Los resultados de los análisis de igualdad y paralelismo llevados a cabo en el software Polo Plus v. 2.0 muestran que ambas poblaciones se comportan diferente (Figura 14).



**Figura 14.** Prueba de paralelismo entre cepa Rockefeller (línea azul) y población de campo (línea roja), en donde se muestra que ambas poblaciones son diferentes.  $P < 0.05$ .

## CAPITULO 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Análisis Probit

Los resultados del análisis Probit muestran que la población en estudio (población Distrito Central) ha desarrollado un grado de resistencia al temefós, con un  $FR_{50}$  calculado de 6.63 para la generación F1. El valor de  $FR_{50}$  expresa cuantas veces más insecticida se necesita para matar el 50% de las larvas de una población en estudio. De acuerdo al criterio usado por Bisset et al (2009) y Chávez et al (2005), el grado de resistencia desarrollado por esta población puede considerarse “moderado” por presentar un valor de  $FR_{50}$  entre 5 y 10 [Bisset et al., 2009; Chávez et al., 2005].

En un estudio reciente llevado a cabo sobre varias generaciones de una población de la zona urbana del municipio de San Salvador, El Salvador, se encontraron valores similares de  $FR_{50}$  en el orden de 5.8 hasta la generación F4 y de 6.0 hasta la F5. Sin embargo, en este estudio los valores para  $DL_{50}$  fueron mucho menores al encontrado para la población Distrito Central (entre 0.021 y 0.034 ppm para la población de El Salvador en contraste con 0.073 ppm para la población Distrito Central), aunque en ambos casos la dosis diagnóstica propuesta por la OMS no fue efectiva sobre poblaciones naturales de *Aedes aegypti* [Ayala and Moreno, 2011].

Los resultados de ambos estudios constituyen dos ejemplos que proporcionan evidencia de que la dosis diagnóstica propuesta por la OMS en 1975 [WHO, 1992], no es efectiva sobre poblaciones naturales de *Aedes aegypti* que han desarrollado un nivel de resistencia

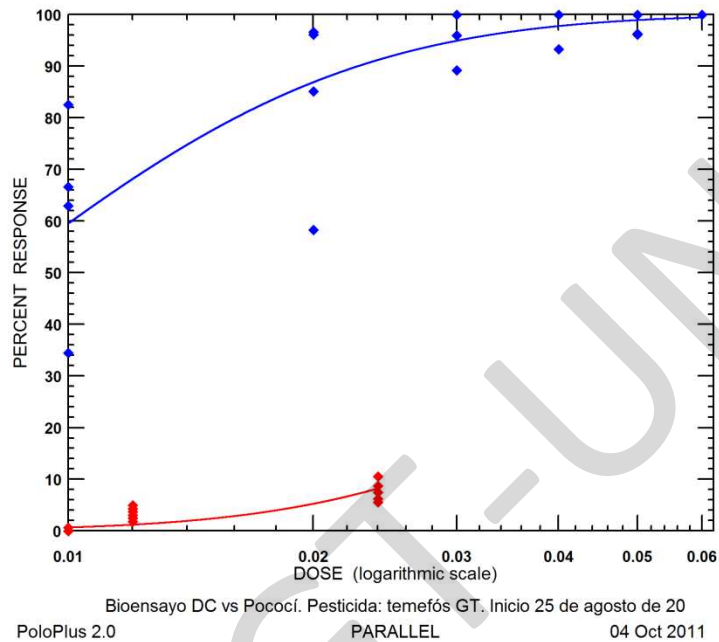
al temefós por presión de selección, pero sigue siendo un referente de comparación por eliminar entre el 98% y 100% de las larvas de la cepa Rockefeller.

La aparición de resistencia en poblaciones naturales de *A. aegypti* en Centroamérica, no debe ser considerado un fenómeno aislado si consideramos que durante los últimos treinta años se ha utilizado temefós como el principal medio químico para el control de este vector tanto en los programas de control de la región, como en otras partes del mundo [Rodríguez et al., 2007]. Casos como el de El Salvador en donde se han registrado altos niveles de resistencia a razón de valores de  $FR_{50}$  de 24.16 para un municipio de San Salvador, son un llamado de alerta tanto para las autoridades de salud de ese vecino país, como para toda la región [Ayala and Moreno, 2011].

Pruebas de resistencia a temefós realizadas recientemente en Costa Rica sobre tres diferentes poblaciones: Heredia, Pococí y Toro amarillo (Víctor Cartín, datos no publicados), con valores de  $DL_{50}$  de 0.012, 0.008 y 0.015 ppm respectivamente, muestran que estas poblaciones son aún susceptibles a dosis entre 0.01 y 0.02 ppm, a diferencia del caso de Honduras. Comparando los datos de la población de Pococí con la población del Distrito Central, se observa una marcada diferencia en la  $DL_{50}$ , con un valor de 0.008 ppm para Pococí, y 0.073 ppm calculado para la población del Distrito Central (Figura 15).

Hasta este momento no se conocen datos publicados sobre la ejecución de pruebas de susceptibilidad a insecticidas en poblaciones naturales del mosquito *A. aegypti* en Honduras, lo que dificulta la evaluación de la evolución en la tolerancia a temefós de cualquier población que se esté estudiando. No obstante, los resultados de este estudio permiten establecer una línea base sobre la respuesta del mosquito al temefós,

proporcionando además una guía sobre la metodología más adecuada a seguir para la determinación de la respuesta a pesticidas en esta especie de mosquitos.



**Figura 15.** Comparación entre DL50 población susceptible (línea azul: Pococí, Costa Rica) y DL50 población tolerante (línea roja: Distrito Central)

A pesar de que los resultados del estudio evidencian un incremento en la tolerancia a temefós en la población estudiada en relación a la cepa susceptible Rockefeller, no se conoce aún el estado de susceptibilidad o nivel de resistencia en otras poblaciones naturales de *Aedes aegypti* del Distrito Central u otros cascos urbanos del país, por lo que se necesitan realizar más ensayos con muestras de otras localidades para establecer si existe una tendencia a la resistencia a temefós. Esta medida permitiría tanto definir

acciones a seguir en los sitios donde se detectara el problema así como focalizar recursos, ya que se sabe que la resistencia puede desarrollarse rápidamente en algunas poblaciones y lentamente en otras, y que esto depende por un lado de factores intrínsecos a la especie, así como de factores operacionales durante el control [Bisset, 2002].

Estos últimos son de suma importancia ya que tienen que ver con el manejo y aplicación del plaguicida que se esté usando, dentro de cuales los más obvios son el tiempo, la dosis y la formulación del plaguicida, todos bajo el control del hombre. Estos factores deben ser monitoreados rigurosa y sistemáticamente por las autoridades de salud, de tal manera que si existe evidencia que alguno de estos falla, se puedan tomar medidas correctivas. En el escenario actual de la resistencia y debido a los resultados encontrados en este estudio, convendría que las autoridades de la Secretaría de Salud del país revisaran particularmente la formulación de temefós que se está aplicando, en la cual están involucrados además la dosis y la tasa de disipación del insecticida.

La aplicación de un control alternativo (físico, químico o biológico) o un control mixto (educación comunitaria, campañas de limpieza, uso de ovicidas como cloro/detergente, el uso de mezclas de insecticidas, controles biológicos), debe ser considerado por el programa nacional de control de dengue de la Secretaría de Salud del país cuando se tiene evidencia que una medida no está siendo eficaz, o cuando la aplicación en conjunto muestre resultados favorables. Esto debe considerarse en el marco de un plan de manejo integrado de control de vectores, que incluya medidas pertinentes al control de mosquitos.

Una de las medidas alternativas al uso de insecticidas que han tenido resultados notables para el control de huevos, larvas y pupas de *A. aegypti* en nuestro país, no solo por su

bajo costo económico, sino además por su fácil aceptación por parte de los miembros de la comunidad, es la mezcla de cloro y detergente denominada “La Untadita”. Dos características notables de la medida son: 1) se enfoca en la eliminación de huevos de *A. aegypti* (no en larvas) al usar la mezcla sobre las paredes de pilas, barriles y otros contenedores de uso permanente al menos una vez por semana 2) la comunidad es el actor principal, por lo que no requiere de la supervisión de las autoridades, entomólogos u otros especialistas una vez que se ha enseñado su aplicación [Sherman et al., 1998].

Esta medida supone un método de bajo costo y altamente eficaz para reducir notablemente las densidades poblacionales del *A. aegypti*, por lo que debería considerarse una medida permanente para alcanzar altos índices de mortalidad de este vector. La integración de la comunidad en las campañas de erradicación de criaderos de mosquitos que lleva a cabo la Secretaría de Salud, podría incluir jornadas de capacitación más regularmente en escuelas, centros comunitarios, alcaldías, etc., como una forma de coadyuvar el control del vector y evitar el uso excesivo de insecticidas y el ahorro de los escasos recursos económicos con los que comúnmente cuentan las dependencias estatales.

Por otro lado, otro enfoque en la aplicación de controles mixtos, es el uso de mezclas de insecticidas el cual asume que de haber resistencia en poblaciones naturales del mosquito, los mecanismos de resistencia a cada miembro de la mezcla son diferentes y que inicialmente existen a una frecuencia tan baja que excluye la posibilidad de que ocurran juntos en un solo individuo de una población dada. Por lo tanto, el insecto que sobrevive a un larvicida en la mezcla, es muerto por el otro insecticida [Bisset, 2002].



Sin embargo, para poder establecer si es oportuno el uso de mezclas u otros productos, es necesario realizar bioensayos con esos productos, de tal manera que se pueda medir la respuesta del insecto blanco a ese control. Otros estudios importantes incluyen pruebas bioquímicas para conocer los mecanismos de resistencia –si se detecta la misma-, y estudios de factores ecológicos que pueden influir en el aumento en la tolerancia a insecticidas por parte de las poblaciones naturales del mosquito.

La implementación e integración de medidas alternativas de control de mosquitos en la estructura del programa nacional de control del dengue, puede ser desarrollado en colaboración con centros de investigación en salud (nacionales, regionales o internacionales) y/o personal capacitado (biólogos, entomólogos, otros) de universidades, que estén o hayan realizado investigación en este campo.

Las observaciones hechas en el campo tanto por entomólogos como por técnicos en salud, sobre el efecto actual que el temefós ejerce en larvas de *A. aegypti*, sumado a resultados obtenidos mediante metodologías estandarizadas como las aplicadas en la presente investigación, son un llamado de alerta que debe servir a las autoridades para realizar un monitoreo permanente de la respuesta del mosquito al larvicida usado en el control focal, y además una oportunidad para realizar pruebas de viabilidad con otros productos.

En Honduras, el uso prolongado de temefós y la aplicación de dosis sub-óptimas (probablemente por la falta de controles en la selección y evaluación de la dosis de este larvicida), podría explicar el desarrollo de una mayor tolerancia del mosquito a este larvicida en particular. Experiencias de países como Argentina y Brasil, en los que existen programas de monitoreo sistemático de la resistencia a insecticidas, y en donde las

pruebas de susceptibilidad se realizan sobre distintas generaciones de una misma población, pueden tomarse como modelos para implementar ensayos permanentes que provean datos sobre el cambio de las poblaciones del mosquito en el tiempo.

No se recomienda abandonar por ahora el uso de temefós mientras no se realicen más pruebas con muestras procedentes de todo el país y se cuente con controles técnico-administrativos que evalúen factores críticos como el tiempo de uso del insecticida, y la formulación y/o dosis de temefós aplicada actualmente en las campañas de abatización. En este último se deben considerar aspectos como dimensiones de los diversos contenedores encontrados en las viviendas en relación a la dosis de larvicida aplicado, y la tasa de disipación del componente activo. Además, se necesita evaluar si existen errores de orden administrativo como la falta de capacitación del personal que aplica el temefós o problemas técnico logísticos con el objetivo de detectar incorrectas prácticas de aplicación del producto.

Lo que se recomienda necesario considerar es el ensayo de nuevos métodos, en especial, aquellos que no supongan un impacto negativo sobre el ambiente natural y las especies que en él viven (como lo hacen los productos químicos). Dos buenos candidatos son *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* y *Ba. sphaericus*, bacterias gram-positivas utilizadas como ingrediente activo en la elaboración de insecticidas biológicos, con resultados alentadores en el control de esta especie [Gomes de Assumpção Filho and da Costa Silva, 2004]. Una formulación comercial de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* está siendo evaluada por La Secretaría de Salud de nuestro país con el objetivo de implementar su uso permanente en las campañas de control vectorial.

## 5.2 Limitaciones y aspectos metodológicos del estudio

### 5.2.1 Duración y diseño del estudio

El estudio se extendió dos meses más de lo que se había previsto, debido a dos razones fundamentales: (1) la falta de suficientes larvas F1 de 3er. estadio que se esperaba tener en el mes de junio (número que se logró alcanzar en el mes de julio); (2) un retraso en la adquisición del insecticida grado técnico requerido para preparar las soluciones de trabajo para los bioensayos. La colecta de campo prevista para el mes de febrero no fue posible hasta el mes de marzo, debido a que para ese entonces las poblaciones del mosquito estaban en niveles marginales (baja densidad poblacional).

El diseño del estudio siguió los criterios establecidos por Bisset et al (2005) para la colecta de huevos de la especie *Aedes aegypti* y para la ejecución de bioensayos con dicha especie [Bisset et al., 2005]. La cría masiva en cautiverio de larvas de *A. aegypti* siguió los criterios sugeridos por varios autores, incluidos el “Manual de indicaciones técnicas para insectarios” del Instituto Pedro Kourí, La Habana, Cuba [Pérez et al., 2004] además de aspectos sugeridos por Singh y Morre [Singh and Morre, 1985]. Los criterios establecidos por Robertson et al, (2007) para el diseño de bioensayos constituyen una guía útil y completa que deberían ser tomados en cuenta en estudios futuros [Robertson et al., 2007].

### 5.2.2 Muestreo de campo

Los resultados obtenidos durante la colecta de huevos de la especie *Aedes aegypti* mediante el uso de ovitrampas en las tres localidades seleccionadas, muestran que este método es efectivo y sensible para el muestreo de mosquitos de esta especie, incluso en meses secos, en los que no se espera encontrar altas densidades poblacionales. Aunque el número de huevos por trampa fue bajo, la viabilidad de los mismos fue la ideal, alcanzando un 100% de eclosión. Sin embargo, el uso de ovitrampas combinado con la colecta directa de larvas encontradas en diferentes recipientes con agua, podría considerarse en futuras investigaciones, ya que podría ahorrar tiempo y recursos. Esta metodología ha sido usada antes por otros autores [Llinás G. et al., 2010].

Una de las limitaciones del método de ovitrampas por sí solo, es su alto costo en tiempo y logística, ya que se requieren varias personas y muchas horas para colocar las trampas y un gran esfuerzo para revisarlas cada cinco o seis días en cada localidad. La metodología del estudio contemplo la intervención de dos personas para dichas tareas, lo que dificultó la ejecución de las mismas. Un mejor acercamiento para aprovechar los recursos de los que se dispone es colocar ovitrampas, larvitrapas (en aquellos casos en los que pueda aplicarse) y coleccionar todas las larvas que se encuentren, las cuales pueden ser separadas posteriormente por género u especie una vez terminado el muestreo.

### 5.2.3 Condiciones de temperatura y humedad

Las condiciones óptimas de temperatura, y humedad, varían para cada especie de mosquito, sugiriéndose valores entre 24 y 28 °C y 70% - 80% de humedad relativa (RH)

para la mayoría de mosquitos tropicales [Consoli and Oliveira, 1994]. Aunque la temperatura se mantuvo dentro de los valores sugeridos para la cría en cautiverio de larvas de *A. aegypti* (28 °C), la humedad promedio durante todo el periodo de estudio fue más baja de lo aconsejado (50% RH), lo que retraso en cierta medida el desarrollo de las larvas.

#### 5.2.4 Ataque de hormigas y hongos

El ataque de hormigas se reportó en los meses de febrero y marzo únicamente. Las hormigas eran atraídas por la solución azucarada presente en las jaulas, a las cuales ingresaban por hendiduras formadas en la base de las mangas de manta o por pequeños agujeros que abrían con sus mandíbulas. Esto se corrigió mediante agregar más remaches entre la manga y el balde y a través de cubrir las hendiduras con silicón caliente, lo cual solucionó el problema de forma satisfactoria y definitiva. No pudo determinarse la especie de hormiga que atacaba las jaulas, lo cual se ha hecho en otros casos [Pérez et al., 2004]. Este evento no perjudicó significativamente el desarrollo del estudio.

Se detecto además la presencia de hongos que colonizaban los algodones con solución azucarada después de dos días puestos en las jaulas, pero tampoco fue posible su clasificación. Los algodones con solución azucarada se reemplazaban de las jaulas cada dos días para evitar una excesiva proliferación de los mismos, pero aún así el hongo reaparecía constantemente. El problema se solucionó parcialmente al limpiar diariamente con una solución de alcohol etílico las paredes de las jaulas. No se detectaron consecuencias evidentes en la reproducción de los mosquitos.

El presente estudio representa un esfuerzo exitoso por establecer una cría en cautiverio de la cepa de referencia Rockefeller, una cepa susceptible a pesticidas de la especie *Aedes aegypti* utilizada como cepa control en estudios de resistencia a insecticidas a nivel mundial. Huevos de la cepa Rockefeller están disponibles desde ahora como resultado del establecimiento de una cría en cautiverio para la ejecución de bioensayos para evaluar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas sobre poblaciones de esta especie.

Se debe hacer énfasis en la eliminación de posibles criaderos durante las campañas de abatización por parte de las autoridades de la Secretaría de salud y continuar las campañas de concientización de la población en esta tarea, ya que su participación es básica para lograr controlar las poblaciones de mosquitos.

## CAPITULO 6. CONCLUSIONES

1. El análisis de los bioensayos realizados sobre la población de mosquitos de la especie *Aedes aegypti* colectada en tres colonias del Distrito Central (Manchén, Villanueva y Kennedy), revela un incremento en la tolerancia de larvas provenientes de estas colonias, lo que implica el desarrollo de una resistencia moderada al insecticida temefós (Abate), evidenciando la necesidad de implementar un monitoreo sistemático de la respuesta de esta especie a este u otros pesticidas en todas las regiones sanitarias del país, a fin de determinar tempranamente la presencia de resistencia en poblaciones naturales del mosquito y tomar las medidas pertinentes.

2. Se necesita implementar con urgencia un programa de vigilancia de la resistencia tanto de larvas como de adultos de *A. aegypti* a los insecticidas utilizados por el Programa Nacional de Control del dengue de la Secretaría de Salud. Un acercamiento importante puede ser el establecimiento de insectarios adecuadamente equipados que realicen el monitoreo permanente de la resistencia a insecticidas en larvas y adultos del mosquito vector del dengue, mediante la metodología de bioensayos.

3. El establecimiento de insectarios en diversas regiones del país contribuiría al desarrollo de investigaciones que permitan establecer tanto factores ambientales como mecanismos intrínsecos de resistencia en poblaciones naturales de *A. aegypti* que conlleven al desarrollo de resistencia en esta especie.

**4.** Debido a que la aplicación de abate excluye algunos de contenedores, sería adecuado realizar una caracterización de depósitos infestados con *Aedes aegypti* en aquellas localidades que año a año representan áreas de alto riesgo de transmisión de dengue en el Distrito Central, con el fin de conocer realmente cuales son los criaderos críticos y focalizar la aplicación del larvicida. Aunque la diversidad de posibles criaderos es amplia y puede variar de un sitio a otro, la caracterización sistemática de estos, proporciona un patrón útil a la hora de priorizar esfuerzos mediante el tratamiento químico.

**5.** Debido a que los métodos químicos de control implican inversiones económicas elevadas, disposiciones legales y administrativas, regulaciones internacionales de seguridad y daños colaterales al ambiente y la salud, es conveniente considerarse la implementación medidas adicionales con impactos económicos menores, de amplia cobertura y de gran efectividad, en las que las comunidades sean agentes importantes, como campañas permanentes de eliminación de criaderos, capacitación comunitaria y el uso de estrategias conductuales como “La Untadita”.

**6.** Futuras investigaciones deben enfocarse en aspectos poco estudiados como las posibles implicaciones de cambios en la biodinámica del vector por cambio climático, interacción con otras especies de dípteros y determinación de otros factores ambientales que puedan condicionar un aumento en la tolerancia a insecticidas usados contra el *A. aegypti* y proveer alternativas de control.



## CAPITULO 7. RECOMENDACIONES

1.El protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas de mosquitos de la especie *Aedes aegypti* propuesto por la Red Latinoamericana de Control de Vectores (RELCOV) y la Fundación Mundo Sano en octubre de 2004, demostró ser muy rígido y complicado, especialmente si es la primera vez que se realizan bioensayos para evaluar la respuesta de insectos a uno o más estímulos. Es un protocolo útil en insectarios de referencia, pero impráctico en estudios de línea base como el presente. Se recomienda consultar otros protocolos para elaborar un procedimiento acorde tanto con las necesidades como capacidades técnicas y logísticas del estudio que se esté llevando a cabo.

2.Aunque no se realizó como parte del estudio una caracterización de los criaderos en donde se encontraron larvas de *Aedes aegypti* durante los muestreos, se observaron altas densidades de larvas y pupas principalmente en pilas y barriles en las tres colonias de colecta, seguidos de canales para aguas lluvias, bases de maceteros, pailas y otros recipientes plásticos encontrados en exteriores de las viviendas, principalmente patios traseros y pasillos laterales.

3.Se recomienda el ensayo de dosis mayores a 0.006 ppm, debido a que dosis menores no inducen una respuesta cuantificable y representan un gasto de tiempo y recursos. Dosis en el orden de 0.01 ppm, 0.02 ppm, 0.03 ppm, 0.04 ppm, 0.05 ppm y 0.06 ppm, son

recomendadas para establecer una nueva ventana de respuestas que permita establecer una nueva línea de susceptibilidad en la población evaluada o en poblaciones por evaluar, de tal manera que se vayan descartando dosis marginales.

4. En futuras evaluaciones de la susceptibilidad o resistencia de poblaciones de *Aedes aegypti* a insecticidas, es recomendable utilizar una combinación de técnicas de muestreo para coleccionar tanto huevos (ovitrampas) como larvas (colecta directa) en las localidades seleccionadas, ya que una de las limitaciones observadas al utilizar solamente ovitrampas, es que el tiempo y esfuerzo requeridos para alcanzar una muestra suficiente para establecer las colonias de trabajo en el laboratorio, aumentó significativamente, aumentando además los recursos invertidos.

5. Otra limitación importante observada en el estudio, es el esfuerzo en horas-hombre requerido (medido en horas de trabajo/persona), tanto para la colecta de huevos como para establecer y mantener la cría en cautiverio de una o más poblaciones de mosquitos en el bioterio de la UNAH. Se necesita de al menos dos personas para poder realizar todo el trabajo involucrado, por lo que se deberá considerar este aspecto si se desea continuar con la cría de la cepa susceptible Rockefeller y las cepas locales que se desee mantener.

6. Se deben continuar ensayando rangos de concentraciones que produzcan respuestas entre un 2% y un 98% de mortalidad en aquellas poblaciones de mosquitos que

correspondan a zonas de alta transmisión de dengue, registrando así los valores  $DL_{50}$  que permitan hacer comparaciones en tiempo y espacio, logrando de esa manera monitorear la evolución de la tolerancia o susceptibilidad del vector al control focal aplicado en el país.

7.El siguiente paso en la investigación es el cubrir varias zonas geográficas del Distrito Central y del país y realizar pruebas de respuesta al larvicida durante todo el año. Además, es conveniente registrar y analizar los resultados producidos por intervenciones externas a los bioensayos, como fumigaciones, jornadas de limpieza y eliminación de depósitos (control físico de criaderos) y otras medidas que puedan ser útiles para causar un impacto sobre las poblaciones naturales del *Aedes aegypti*.

**CAPITULO 8.REFERENCIAS**

Ávila Montes GA, Martínez M, Sherman C, Fernández Cerna E. 2004. Evaluación de un módulo escolar sobre dengue y *Aedes aegypti* dirigido a escolares en Honduras. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health 16(2):84-94.

Ayala R, Moreno M. 2011. Resistencia al temefos por presión de selección en una población de *Aedes aegypti* de El Salvador. Minerva Revista en Línea, CIC-UES 2(1):1-9.

Becker N. 1989. Life strategies of mosquitoes as an adaptation to their habitats. Bull Soc Vector Ecol 14(1):6-25.

Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Dahl C, Kaiser A. 2010. Mosquitoes and Their Control: Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2003,2010.

Biber PA, Dueñas JR, Almeida FL, Gardenal CN, Almirón WR. 2006. Laboratory Evaluation of Susceptibility of Natural Subpopulations of *Aedes aegypti* Larvae to Temephos. Journal of the American Mosquito Control Association 22(3):408-411.

Bisset J, Blanco S, Braga I, Coto H, Massuh H, Moncayo Á, Nathan M, Orellano P, Vázquez Cangas J, Zerba E. Protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas de mosquitos de la especie *Aedes aegypti*. In: vectores RLdcd, editor; 2005; Ciudad de Iguazú,. RELCOV.

Bisset JA. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 54:202-219.

Bisset JA, Rodríguez MM, San Martín JL, Romero JE, Montoya R. 2009. Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 26(3):229-234.

Castillo G. 2004. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones.: IDRC/IMTA. 202 p.

Clemons A, Mori A, Haugen M, Severson D, Duman-Scheel M. 2010. *Aedes aegypti* Culturing and Egg Collection. *Cold Spring Harb Protoc*.

Consoli R, Oliveira RL, editors. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz.

Chávez J, Córdova O, Vargas F. 2005. Niveles de susceptibilidad a temefós en el vector transmisor del dengue en Trujillo, Perú. *An Fac Med Lima* 66(1):53-56.

Chen CD, Lee HL. 2006. Laboratory bioefficacy of CREEK 1.0G (temephos) against *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) larvae. *Tropical Biomedicine* 23(2):220-223.

Chen CD, Nazni WA, Lee HL, Sofian-Azirun M. 2005. Susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to temephos in four study sites in Kuala Lumpur City Center and Selangor State, Malaysia. *Tropical Biomedicine* 22(2):207-216.

Chiou-Feng L, Shu-Wen W, Hsien-Jen C, Huan-Yao L, Yee-Shin L. 2006. Autoimmune Pathogenesis in Dengue Virus Infection. *Viral Immunology* 19(2):127-132.

del Ángel RM. 2006. Entrada del virus del dengue: Moléculas que pueden modular la patogenia viral. *Cinvestav* 25(3):38-43.

Duque Luna JE, Ferrer Martins M, dos Anjos AF, Fumio Kuwabara E, Navarro-Silva MA. 2004. Susceptibility of *Aedes aegypti* to temephos and cypermethrin insecticides, Brazil. *Rev Saúde Pública* 38(6).

Frutos E. 1996. Análisis de Probit y de Correspondencia: En: Lecuona R. (ed), *Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga*, Buenos Aires, Argentina.

García I. 1977. Fauna cubana de mosquitos y sus criaderos típicos.

Gomes de Assumpção Filho U, da Costa Silva W. 2004. Aplicación de formulaciones de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SH-14 contra *Aedes (S) aegypti*. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 56:163-166.

Gubler DJ. 1998. Resurgent Vector-Borne Diseases as a Global Health Problem. *Emerging Infectious Diseases* 4(3):442-450.

Gubler DJ. 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in Microbiology* 10(2):100-103.

Hamdan H, Sofian-Azirun M, Nazni WA, Lee HL. 2005. Insecticide resistance development in *Culex quinquefasciatus* (Say), *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) larvae against malathion, permethrin and temephos. *Tropical Biomedicine* 22(1):45-52.

Hammond SN, Gordon AL, Lugo EdC, Moreno G, Kuan GM, López MM, López JD, Delgado MA, Valle SI, Espinoza PM, Harris E. 2007. Characterization of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Production Sites in Urban Nicaragua. *Journal of Medical Entomology* 44(5):851-860.

Harbach RE. 2007. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa* 1668:591-638.

Hastings NAJ, Peacock JB. 1974. *Statistical Distributions, A Handbook for Students and Practitioners.* : Butterworths, London.

Hemme RR, Tank JL, Chadee DD, Severson DW. 2009. Environmental conditions in water storage drums and influences on *Aedes aegypti* in Trinidad, West Indies. *Acta Tropica* 112:59-66.

Instituto Nacional de Ecología de México I. 2009. Temefós datos de identificación México, D.F.

Kongmee M, Prabaripai A, Akwatanakul P, Bangs MJ, Chareonviriyaphap T. 2004. Behavioral Responses of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Exposed to Deltamethrin and Possible Implications for Disease Control. *Journal of Medical Entomology* 41(6):1055-1063.

Krysan JL, Dunley J. 2010. Insect Growth Regulators. Tree Fruit Research and Extension Center: Orchard Pest Management: Washington State University.

Laurentino de Carvalho M, Dutra Caldas E, Degallier N, de Tarso Ribeiro Vilarinhos P, de Souza LC, Cavalcanti Yoshizawa MA, Britto Knox M, de Oliveira C. 2004. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to the insecticide temephos in the Federal District, Brazil. *Rev Saúde Pública* 38(5).

Llinás G. A, Seccacini E, CN. G, Licastro S. 2010. Current resistance status to temephos in *Aedes aegypti* from different regions of Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 105(1):113-116.



Marti GA, Micieli MV, Scorsetti AC, Liljeström G. 2004. Evaluation of *Mesocyclops annulatus* (Copepoda: Cyclopoidea) as a Control Agent of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 99(5):535-540.

Mazine C, Macoríz ML, Andrighetti MT, Yasumaru S, Silva ME, Nelson MJ. 1996. Disposable containers as larval habitats for *Aedes aegypti* in a city with regular refuse collection: a study in Marília, Sao Paulo State, Brazil. Acta Tropica 62:1-13.

Mellado-Sánchez G, García-Cordero J, Luria-Pérez R, Lázaro-Olan L, Santos-Argumedo L, Gutiérrez-Castañeda B, Estrada-García I, Cedillo-Barrón L. 2005. DNA Priming E and NS1 Constructs–Homologous Proteins Boosting Immunization Strategy to Improve Immune Response Against Dengue in Mice. Viral Immunology 18(4):709-721.

Nathan MB, Knudsen AB. 1991. *Aedes aegypti* infestation characteristics in several Caribbean countries and implications for community based integrated control. J Am Mosq Control Assoc 7(3):400-4004.

Neal JWJ. 1976. A Manual for Determining Small Dosage Calculations of Pesticides and Conversion Tables The Entomological Society of America. 71 p.

OPS. 1995. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Washington, D. C. 110 p.

Palomino S M, León C W, Valencia V P, Cárdenas F, Ancca J J. 2007. Evaluación de campo del efecto residual de la Deltametrina sobre la mortalidad y *Knockdown* en *Triatoma infestans*, según tipo de superficie en Arequipa-Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica 24(2):136-143.

Palomino S M, Solari L, León C W, Vega H R, Vergaray C M, Cubillas L, Mosqueda C R, García A N. 2006. Evaluación del efecto residual del temefós en larvas de *Aedes aegypti* en Lima, Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica 23(3):158-162.

Pan American Health Organization. 2008. Number of reported cases of dengue & dengue haemorrhagic fever (DHF). Region of the Americas (by country and subregion).

Paul A, Harrington LC, Scott JG. 2006. Evaluation of Novel Insecticides for Control of Dengue Vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology 43(1):55-60.

Pérez-Guerra CL, Seda H, García-Rivera EJ, Clark GG. 2005. Knowledge and attitudes in Puerto Rico concerning dengue prevention. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health 17(4):243-253.

Pérez O, Rodríguez J, Bisset JA, Leyva M, Díaz M, Fuentes O, Ramos F, González R, García I. 2004. Manual de Indicaciones Técnicas para Insectarios. Ciudad de la Habana: Editorial Ciencias Médicas.

Pérez VI. 1956. Los ixódidos y culícidos de Cuba. Su historia natural y médica.

Pethuan S, Jirakanjanakit N, Saengtharutip S, Chareonviriyaphap T, Kaewpa D, Rongnoparut P. 2007. Biochemical studies of insecticide resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Tropical Biomedicine* 24(1):7-15.

Ponlawat A, Harrington LC. 2005. Blood Feeding Patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. *Journal of Medical Entomology* 42(5):844-849.

Pothikasikorn J, Boonplueang R, Suebsaeng C, Khaengraeng R, Chareonviriyaphap T. 2010. Feeding response of *Aedes aegypti* and *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae) using out-of-date human blood in a membrane feeding apparatus. *Journal of Vector Ecology* 35(1):149-155.

RAP-AL. 2009. Ficha técnica: Temefós. Plaguicida con Prontuario: Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina.

Red Latinoamericana de control de vectores. 2005. Protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas de mosquitos de la especie *Aedes aegypti*. Ciudad de Iguazú,: RELCOV.

Rigau-Pérez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. 1998. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 352:971-977.

Robertson JL, Preisler HK. 1992. Pesticide Bioassays with Arthropods, 1st ed.: CRC Press, Boca Raton, FL.

Robertson JL, Russell RM, Preisler HK, Savin NE. 2007. Bioassays with Arthropods: CRC Press.

Rodríguez MM, Bisset J, Molina de Fernandez D, Lauzán L, Soca A. 2001. Detection of Insecticide Resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba and Venezuela. *Journal of Medical Entomology* 38(5):623-628.

Rodríguez MM, Bisset J, Ruiz M, Soca A. 2002. Cross-Resistance to Pyrethroid and Organophosphorus Insecticides Induced by Selection with Temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *Journal of Medical Entomology* 39(6):882-888.

Rodríguez MM, Bisset JA, Fernández D. 2007. Levels of Insecticide Resistance and Resistance Mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American Countries. *Journal of the American Mosquito Control Association* 23(4):420-429.

Rodríguez MM, Bisset JA, Fernández D, Pérez O. 2004. Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de la esterasa A4 asociada con la resistencia a temefós. *Rev Cubana Med Trop* 56(1):54-60.

Rosa-Freitas MG, Schreiber KV, Tsouris P, de Souza Weimann ET, Luitgards-Moura JF. 2006. Associations between dengue and combinations of weather factors in a city in the Brazilian Amazon. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 20(4):256-267.

Rossi GC, Almirón WR. 2004. Clave ilustrada para la identificación de larvas de mosquitos de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina. Fundación MS, editor. Buenos Aires. 53 p.

Rueda LM. 2004. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with Dengue Virus Transmission: Magnolia Press. *Zootaxa* 589. 60 p.

Rui-De X, Arshad A, Barnard DR. 2008. Host species diversity and post-blood feeding carbohydrate availability enhance survival of females and fecundity in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Experimental Parasitology* 119:225-228.

Russell RM, Robertson JL, Savin NE. 1977. Polo: A New Computer Program For Probit Analysis. *ESA Bulletin* 23(3):209-213.

Sánchez L, Pérez D, Alfonso L, Castro M, Sánchez LM, Van der Stuyft P, Kourí G. 2008. Estrategia de educación popular para promover la participación comunitaria en la prevención del dengue en Cuba. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 24(1):61-69.

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

Sherman C, Fernández EA, Chan AS, Lozano RC, Leontsini E, Winch P. 1998. La Untadita: A procedure for maintaining washbasins and drums free of *Aedes aegypti* based on modification of existing practices. Am J Trop Med Hyg 58(2):257-262.

Silva WJ, Dória GAA, Maia RT, Nunes RS, Carvalho GA, Blank AF, Alves PB, Marcal RM, Cavalcanti SCH. 2008. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. Bioresource Technology 99:3251-3255.

Singh P, Morre RF. 1985. Handbook of Insect Rearing: Elsevier.

Sutthanont N, Choochote W, Tuetun B, Junkum A, Jitpakdi A, Chaithong U, Riyong D, Pitasawat B. 2010. Chemical composition and larvicidal activity of edible plant-derived essential oils against the pyrethroid-susceptible and -resistant strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Journal of Vector Ecology 35(1):106-115.

Thacker JRM. 2002. An Introduction to Arthropod Pest Control: Cambridge University Press.

The Wellcome Trust. 2005. Dengue [CD-ROM].

Troyo A, Porcelain SL, Calderón-Arguedas O, Chadee DD, Beier JC. 2006. Dengue in Costa Rica: the gap in local scientific research. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 20(5):350-360.

Tsunoda T, Fukuchi A, Nanbara S, Takagi M. 2010. Effect of body size and sugar meals on oviposition of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology* 35(1):56-60.

Varela F, M S. 2003. Estudio Ecológico de la Fiebre del Dengue y el Dengue Hemorrágico en el municipio de Girardot-Colombia. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona. 129 p.

WHO. 1992. Vector resistance to pesticides. Geneva: World Health Organization.

WHO/TDR. 2009. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control - New edition.

Woodring J, Davidson E. 1996. Biological control of mosquitoes: University Press of Colorado, USA.

World Health Organization. 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva: WHO;1981 (WHO/VBC/8180).

Yee DA, Kesavaraju B, Juliano SA. 2004. Larval feeding behavior of three co-occurring species of container mosquitoes. *J Vector Ecol* 29(2):315-322.

Yu SJ. 2008. *The toxicology and biochemistry of insecticides*: CRC Press. 283 p.

Zhao B, Prince G, Horswood R, Eckels K, Summers P, Chanock R, Lai C-J. 1987. Expression of Dengue Virus Structural Proteins and Nonstructural Protein NS<sub>1</sub> by a Recombinant Vaccinia Virus. *Journal of Virology* 61(12):4019-4022.



**ANEXO A.**

Modelo de ovitrampa utilizado para el estudio.

Recipiente de plástico color negro, de 12.4 cm de alto, 12 cm de diámetro en su parte superior y 9 cm de diámetro en su parte inferior. El volumen total del recipiente es de 800 ml; la ovitrampa será llenada con agua de la llave hasta un volumen de 300 ml. Se colocará papel absorbente o papel filtro como sustrato para la ovipostura de los huevos. En la imagen se muestra como sustrato para los huevos una paleta de madera colocada verticalmente en el recipiente, pero en este estudio esta paleta será substituida por papel filtro de uso comercial (usado en percoladoras de café).



| de

),

**ANEXO B.**

Clave ilustrada para la clasificación de larvas de mosquitos de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina, publicada por la Fundación Mundo Sano, Ciudad de Buenos Aires, República Argentina, 2004.

UDI-DEGT-UNAH

## Capítulo 2 2.1 Morfología de la larva de cuarto estadio

El cuerpo de la larva está cubierto de un tejido suave y membranoso, aunque en algunas partes presenta placas endurecidas, esclerotizadas. Cabe recordar que las tres regiones del cuerpo son cabeza, tórax y abdomen (Figura 7). La cabeza y el sifón están totalmente esclerotizados, mientras que el tórax y el abdomen son principalmente membranosos.

El cuerpo de la larva posee numerosas cerdas, así como espículas y espinas, dependiendo de las distintas especies. Muchos caracteres taxonómicos importantes, es decir, que permiten determinar los géneros y especies de mosquitos, se basan en el número y posición de las cerdas.

**CARACTERÍSTICAS DE LAS REGIONES DEL CUERPO.**  
**Cabeza.** Posee las piezas bucales en posición anterior y ventral, hacia abajo, consistentes en varias partes. Lo más llamativo son los cepillos bucales que en la mayoría de las larvas constituyen un grupo de cerdas largas y finas; en las depredadoras, aparecen como varillas curvadas a modo de ganchos para atrapar a sus presas. Las antenas tienen forma de tubo y están localizadas anterior y lateralmente; también llevan cerdas que varían en forma, tamaño y localización en las distintas especies. En la parte dorsal de la cabeza también se encuentran cerdas de importancia para la determinación específica.

**Tórax.** Se presenta como una región corporal sin divisiones, no obstante estar formado por tres segmentos, los que pueden distinguirse por los grupos de cerdas que cada uno presenta.

**Abdomen.** Consta de diez segmentos, siendo los siete primeros similares entre sí, a diferencia de los tres restantes que están modificados para respirar y nadar. El segmento VIII posee los órganos respiratorios externos; en los mosquitos del género *Anopheles* el aparato espiracular está en posición dorsal, directamente unido a la pared de dicho segmento; este aparato espiracular se presenta como una estructura fuertemente esclerotizada. En mosquitos de los géneros *Aedes*, *Culex*, *Mansonia*, *Ochlerotatus*, *Psorophora*, *Toxorhynchites* y *Uranotaenia*, entre otros, el aparato espiracular está en el extremo del sifón. Este es de forma y tamaño variable en las diferentes especies de mosquitos. En la mayoría

## CAPITULO II MORFOLOGIA DE LA LARVA DE CUARTO ESTADIO

de los géneros que presentan sifón, éste posee una hilera de espinas llamadas pecten, generalmente restringida a la mitad basal; en algunos grupos el pecten está ausente. En el VIII segmento, *Aedes*, *Culex*, *Mansonia*, *Ochlerotatus*, *Psorophora*, *Toxorhynchites* y *Uranotaenia*, entre otros, presentan los dientes del peine dispuesto lateralmente; su forma y número varía en las distintas especies. El segmento VIII y IX se consideran unidos.

El segmento X, o segmento anal, posee una

placa, llamada silla de montar, que lo abraza, dos o cuatro lóbulos terminales gruesos llamados papilas anales y la brocha ventral o cerda 4-X. Esta última se compone de una serie de cerdas en posición ventral, inferior y posterior que parten de un grupo de barras esclerotizadas llamada grilla, excepto en *Haemagogus* donde es reemplazada por un promontorio. Estas cerdas tienen importancia taxonómica.

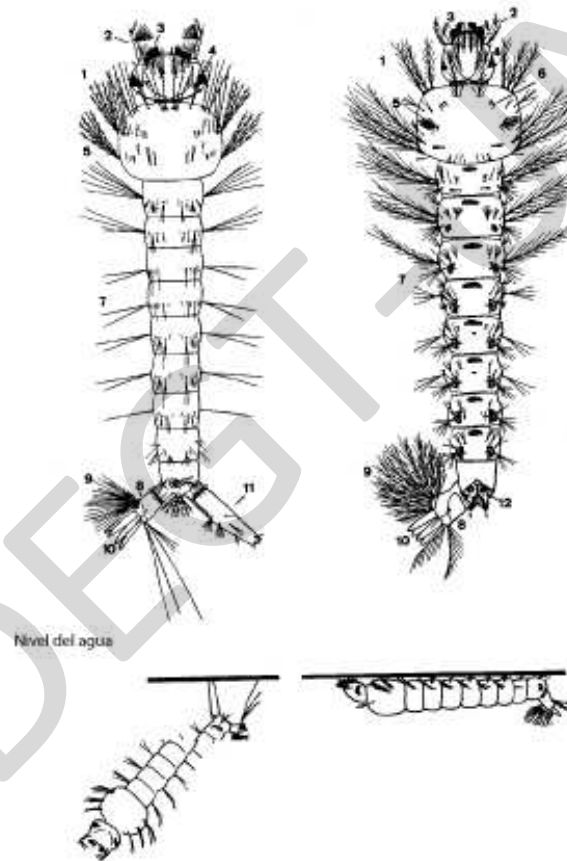


Figura 7. Morfología de la larva de cuarto estadio, en vista dorsal. Larva del género *Anopheles* a la derecha, del género *Culex* a la izquierda.

1: Cabeza, 2: Antena, 3: Cepillo Bucal, 4: Ojo, 5: Tórax, 6: Tubérculo, 7: Abdomen, 8: Segmento X, 9: Brocha Ventral o Cerda 4-X, 10: Papilas Anales, 11: Sifón Respiratorio, 12: Espiráculo.

Nota: En los esquemas de la larva de *Culex*, los segmentos abdominales VII, VIII y X están dibujados en vista lateral, al igual que el segmento abdominal X de *Anopheles* de la parte superior.

## CAPÍTULO II CLAVE ILUSTRADA PARA LARVAS DE CUARTO ESTADIO QUE SE CRIAN EN RECIPIENTES ARTIFICIALES

## 2.2 Clave ilustrada para larvas de cuarto estadio que se crían en recipientes artificiales

GÉNEROS Y ESPECIES QUE SE INCLUYEN EN LA CLAVE

La clave incluye diez géneros y once especies, que se detallan a continuación:

GENERO	ESPECIE
Aedes	aegypti
	albopictus
Anopheles	
Culex	pipiens quinquefasciatus
Haemagogus	
Limatus	durhamii
Ochlerotatus	fluviatilis
	milleri
	scapularis
	terrens
Orthopodomyia	sampaioi
Psorophora	ciliata
	cingulata
Toxorhynchites	
Uranotaenia	

Se incluyen *Limatus durhamii* y *Orthopodomyia sampaioi*, puesto que hasta el presente son las únicas especies de estos géneros citadas para la Argentina. La clave comprende las especies *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Ochlerotatus fluviatilis*, *Ochlerotatus milleri*, *Ochlerotatus scapularis*, *Ochlerotatus terreus*, *Psorophora ciliata* y *Psorophora cingulata*, mencionándose, además, características distintivas de *Culex pipiens quinquefasciatus*. Se incluyen especies de *Aedes*, *Ochlerotatus* y *Psorophora* en función de que estos tres géneros presentan características afines, también presentes en *Haemagogus* aunque fácilmente

distinguibles, no así los restantes géneros, es decir, *Anopheles*, *Culex*, *Toxorhynchites* y *Uranotaenia*, que difieren notoriamente de los anteriores.

### USO DE LA CLAVE

La clave está organizada teniendo en cuenta características morfológicas de las larvas que permitan distinguir los diferentes géneros y especies. Tales características se presentan como dilemas, es decir, pares de propuestas que usted tendrá que cotejar con las larvas que desea determinar.

Al comenzar con la clave, Ud. encontrará las dos primeras propuestas, debiendo optar por una de ellas de acuerdo a la que coincida con el ejemplar que observa. La primera característica de la clave se refiere a la presencia o ausencia de sifón en la larva. Por ejemplo, si la larva que observa no tiene sifón respiratorio, entonces dicha larva es de *Anopheles*, y por lo tanto ya determinó su ejemplar a nivel de género. En caso contrario, es decir, si la larva posee sifón respiratorio, entonces deberá pasar al punto dos de la clave donde encontrará otro dilema, debiendo optar nuevamente por una de las propuestas. Usted deberá seguir este procedimiento hasta que llegue a determinar el género o bien el género y especie de la larva que observa. Las claves están ilustradas para facilitarle la comprensión de las características indicadas en cada dilema y la observación en su ejemplar. Algunas ilustraciones están simplificadas con líneas de corte, o bien no se dibuja la totalidad de las cerdas que no son relevantes en el dilema.

Debe tenerse en cuenta que la clave no incluye todos los géneros y especies presentes en la Argentina. Por lo tanto, si no llega a determinar su ejemplar, es altamente probable que el mismo pertenezca a otro género que no está incluido en esta clave. Desde el punto de vista operativo, los géneros y especies no considerados en este trabajo no son relevantes en el marco del Programa de Prevención y Control del Dengue. De todos modos, aquellos ejemplares no determinados pueden ser remitidos a los laboratorios de referencia de los autores, siguiendo las recomendaciones respecto a conservación y envío de material detalladas en el apéndice.

CAPITULO II CLAVE ILUSTRADA PARA LARVAS DE CUARTO ESTADIO QUE SE CRIAN EN RECIPIENTES ARTIFICIALES

CLAVE PARA GÉNEROS Y ESPECIES

**1**

- Segmento abdominal VIII con sifón respiratorio. (Fig. 8) ..... > 2
- Segmento abdominal VIII sin sifón respiratorio. (Fig. 9) ..... Anopheles

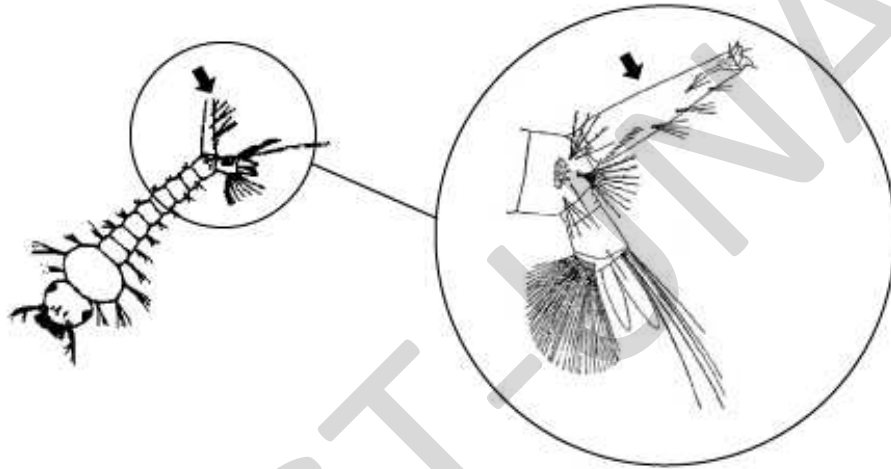


Figura 8. Extremo del abdomen de Culex.

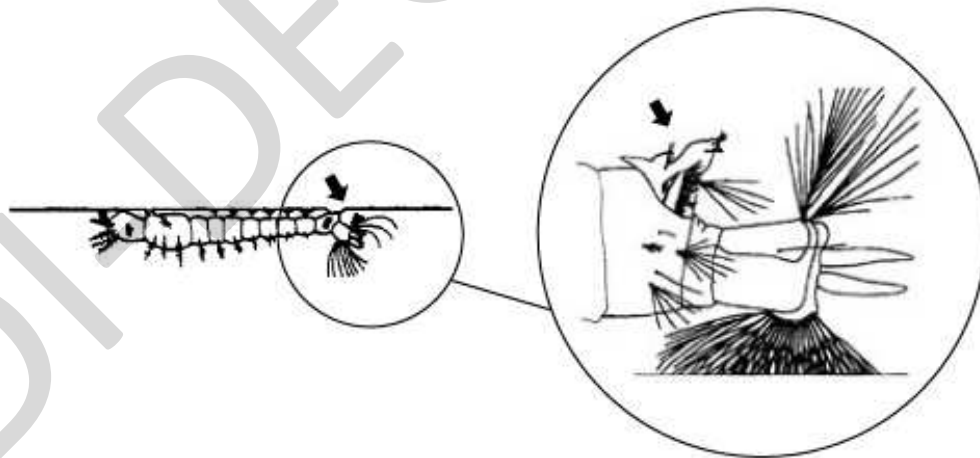


Figura 9. Extremo del abdomen de Anopheles.

CAPITULO II CLAVE ILUSTRADA PARA LARVAS DE CUARTO ESTADIO QUE SE CRIAN EN RECIPIENTES ARTIFICIALES

2

- Brocha ventral (4-X) formada por un par de cerdas. (Fig. 10) ..... *Limatus durhamii*
- Brocha ventral (4-X) formada por un mínimo de 4 pares de cerdas. (Fig. 11) ..... > 3

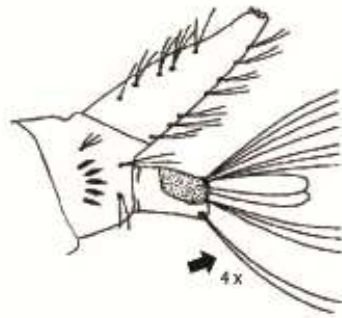


Figura 10. Brocha ventral de *Limatus*.

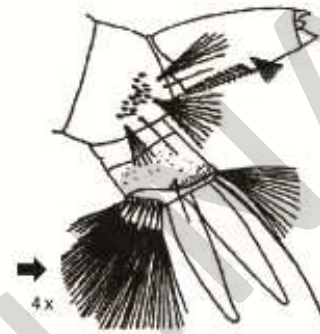


Figura 11. Brocha ventral de *Aedes*.

3

- Sifón sin pecten. (Fig. 12) ..... > 4
- Sifón con pecten. (Fig. 13) ..... > 5

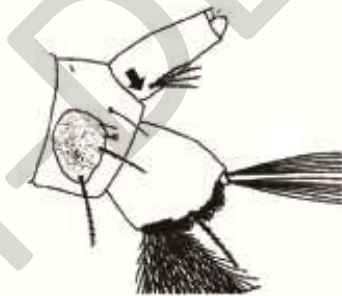


Figura 12. Sifón de *Toxorhynchites*.

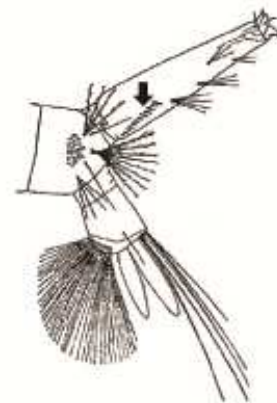


Figura 13. Sifón de *Culex*.

CAPITULO II CLAVE ILUSTRADA PARA LARVAS DE CUARTO ESTADIO QUE SE CRIAN EN RECIPIENTES ARTIFICIALES

4

- Segmentos abdominales VII y VIII con placa esclerotizada dorsal; segmento VIII con dientes largos en el peine. (Fig. 14) ..... Orthopodomyia sampaiol
- Segmentos abdominales VII y VIII sin placa esclerotizada dorsal; peine del segmento VIII reemplazado por una placa con dos cerdas. (Fig. 15) ..... Toxorhynchites

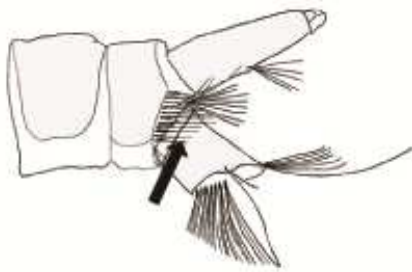


Figura 14. Extremo del abdomen de Orthopodomyia sampaiol

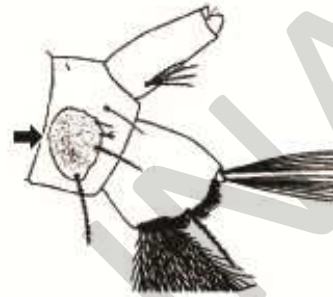


Figura 15. Extremo del abdomen de Toxorhynchites.

5

- Los dientes del peine (segmento abdominal VIII) parten de una placa esclerotizada grande; cabeza más larga que ancha. (Fig. 16) ..... Uranotaenia
- Los dientes del peine libres (segmento abdominal VIII) no parten de una placa esclerotizada; cabeza más ancha que larga. (Fig. 17) ..... > 6

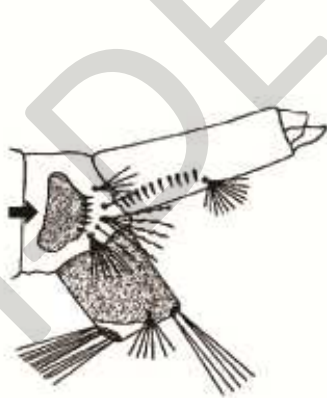


Figura 16. Extremo del abdomen de Uranotaenia.



Figura 17. Extremo del abdomen de Culex .



CAPITULO II CLAVE ILUSTRADA PARA LARVAS DE CUARTO ESTADIO QUE SE CRIAN EN RECIPIENTES ARTIFICIALES

6

- Sifón con 3 o más pares de cerdas simples o múltiples. (Fig. 18) .....
- Sifón con un par de cerdas simple o múltiple. (Fig. 19) .....

Culex \*

> 7

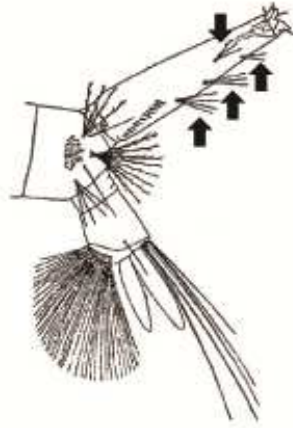


Figura 18. Extremo del abdomen de Culex .

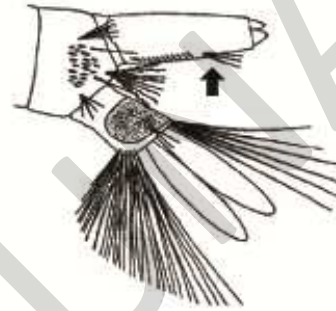


Figura 19. Extremo del abdomen de Aedes .

\*] Culex pipiens quinquefasciatus presenta 4 pares de cerdas en el sifón (figura 18). También es característica la coloración más oscura (castaño) en la parte posterior de la cabeza.

7

- Silla de montar del segmento X completa. (Fig. 20) .....
- Silla de montar del segmento X incompleta. (Fig. 21) .....

> 8

> 9

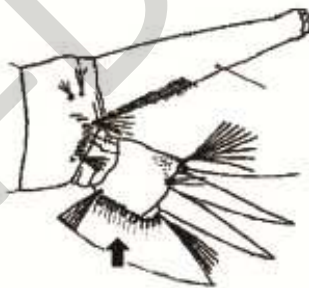


Figura 20. Extremo del abdomen de Psorophora .



Figura 21. Extremo del abdomen de Aedes .

CAPITULO II CLAVE ILUSTRADA PARA LARVAS DE CUARTO ESTADIO QUE SE CRIAN EN RECIPIENTES ARTIFICIALES

8

- Brocha ventral con más de 4 pares de cerdas unidos a la silla de montar; dientes del peine en VIII en una fila; cerda 1 del sifón simple. (Fig. 22) ..... *Psorophora ciliata*
- Cerdas de la brocha ventral no unidas a la silla de montar; dientes del peine en VIII en dos filas irregulares; cerda 1 del sifón múltiple. (Fig. 23) ..... *Ochlerotatus scapularis*

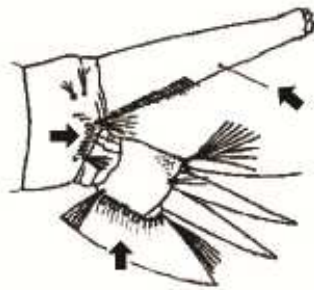


Figura 22. Extremo del abdomen de *Psorophora ciliata*.

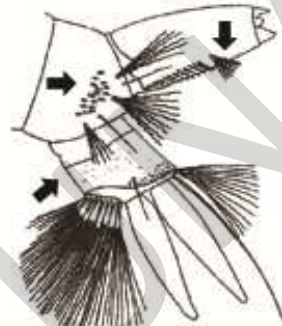


Figura 23. Extremo del abdomen de *Ochlerotatus scapularis*.

9

- Cerdas de la brocha ventral ocupando más de la mitad de la longitud del segmento X; sifón inflado hacia la mitad; cerda 1 del sifón simple. (Fig. 24) ..... *Psorophora cingulata*
- Cerdas de la brocha ventral naciendo en el tercio apical del segmento X; sifón no inflado en el medio; cerda 1 del sifón múltiple. (Fig. 26) ..... > 10

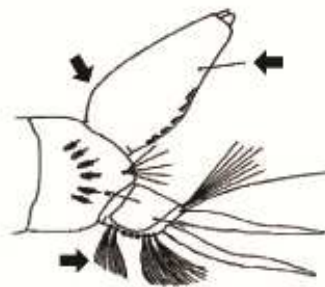


Figura 24. Extremo del abdomen de *Psorophora cingulata*.

CAPITULO II CLAVE ILUSTRADA PARA LARVAS DE CUARTO ESTADIO QUE SE CRIAN EN RECIPIENTES ARTIFICIALES

10.

- Brocha ventral formada por 5 o 6 pares de cerdas que nacen de un promontorio.  
(Fig. 25) .....

Haemagogus

- Brocha ventral con cinco o más pares de cerdas que nacen de una grilla.  
(Fig. 26) .....

> 11

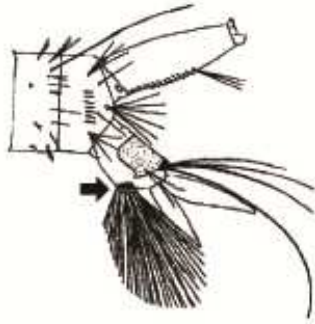


Figura 25. Extremo del abdomen de Haemagogus.



Figura 26. Extremo del abdomen de Aedes.

11.

- Dientes del peine del segmento VIII dispuestos en una fila, con espina central larga; brocha ventral formada por cinco pares de cerdas (Fig. 27) .....

Aedes > 12

- Dientes del peine del segmento VIII dispuestos en varias filas, usualmente con fleco; brocha ventral con más de cinco pares de cerdas (Fig. 28) .....

Ochlerotatus > 13



Figura 27. Extremo del abdomen de Aedes.



Figura 28. Extremo del abdomen de Ochlerotatus.

12

- Tórax con espinas laterales muy evidentes; dientes del peine del segmento VIII con espinas laterales visibles; cerda 7 de la cabeza simple. (Figs. 29 a, b, c) ..... *Aedes aegypti*
- Tórax con espinas laterales cortas; dientes del peine del segmento VIII con espinas laterales muy pequeñas; cerda 7 de la cabeza doble o triple. (Figs. 30 a, b, c) ..... *Aedes albopictus*



(a) Tórax



Diente del peine

(b) Diente del peine. Extremo del abdomen.

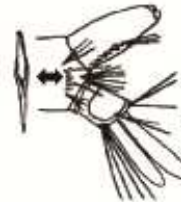


(c) Mitad izquierda de la cabeza en vista dorsal.

Figura 29. *Aedes aegypti*.



(a) Tórax



Diente del peine

(b) Diente del peine. Extremo del abdomen.



(c) Mitad izquierda de la cabeza en vista dorsal.

Figura 30. *Aedes albopictus*.

CAPITULO II CLAVE ILUSTRADA PARA LARVAS DE CUARTO ESTADIO QUE SE CRIAN EN RECIPIENTES ARTIFICIALES

13

- Antena cubierta con espículas muy evidentes, cerda 1 de la antena múltiple, naciendo en el medio de la misma; silla de montar con espículas grandes en el borde posterior. (Fig. 31) ..... Ochlerotatus milleri

- Antena cubierta con pequeñas espículas o sin ellas; cerda 1 de la antena variable; silla de montar con pequeñas espículas o sin ellas en el borde posterior. (Fig. 32) ..... > 14

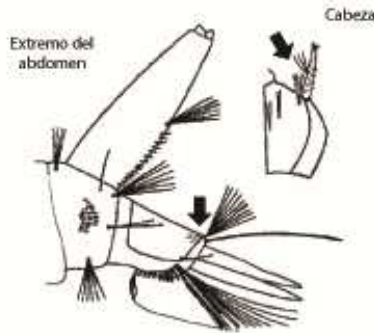


Figura 31. Cabeza y extremo del abdomen de Ochlerotatus milleri .

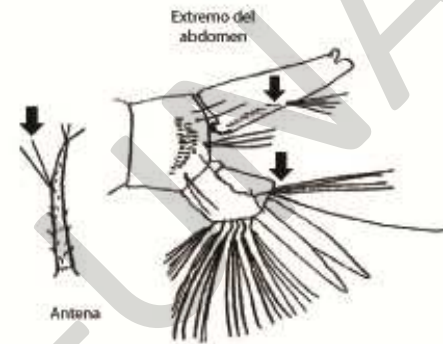


Figura 32. Antena y extremo del abdomen de Ochlerotatus fluviatilis.

14

- Antena con espículas; cerda 1 de la antena doble; última espina del pecten más separada distalmente; borde posterior de la silla de montar sin espículas. (Fig. 32) ..... Ochlerotatus fluviatilis

- Antena sin espículas; cerda 1 de la antena simple; espinas del pecten equidistantes; borde posterior de la silla de montar con espículas. (Fig. 33) ..... Ochlerotatus terreus

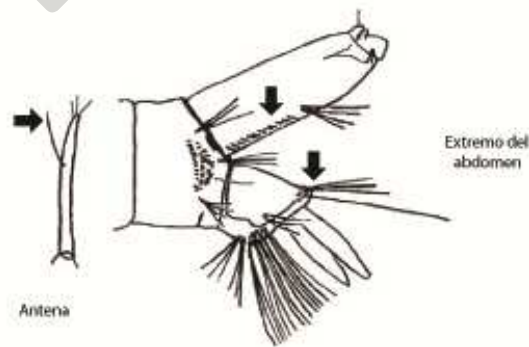
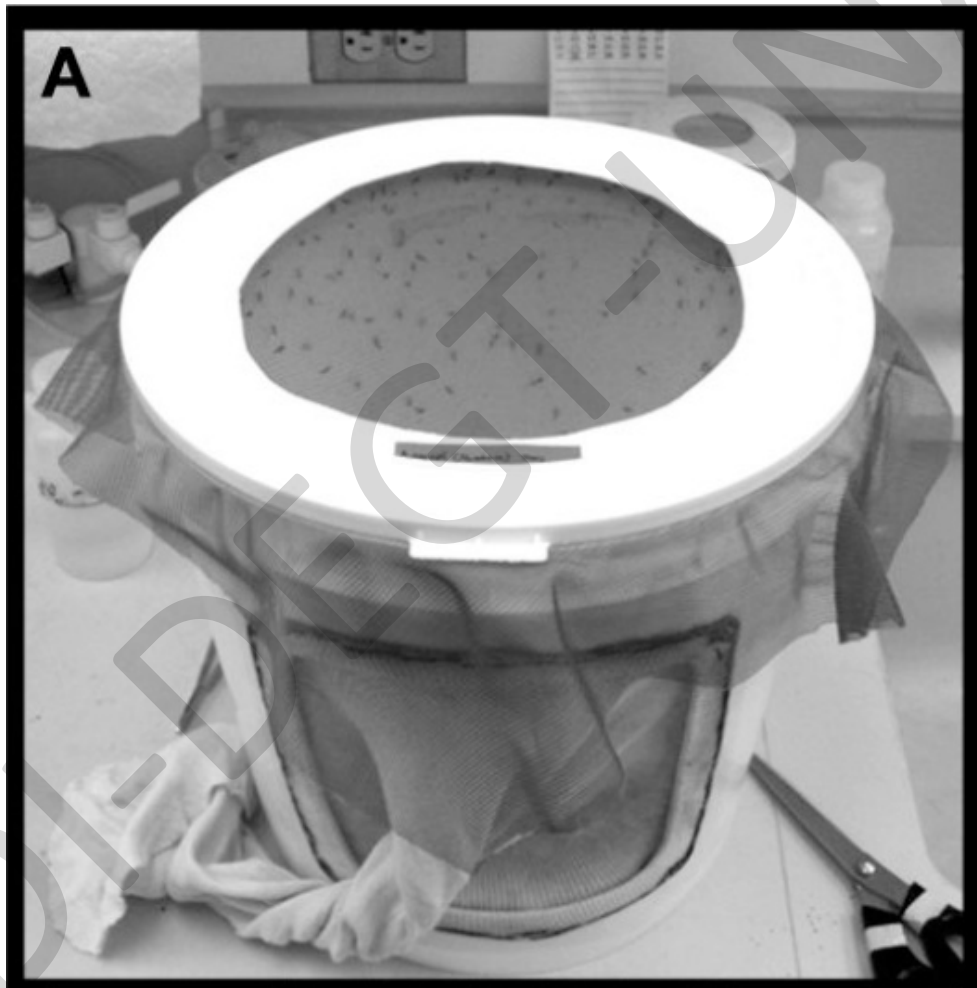


Figura 33. Antena y extremo del abdomen de Ochlerotatus terreus.

## ANEXO C.

Modelo de jaula (balde plástico modificado) utilizado para la cría de mosquitos adultos.

Se hicieron modificaciones a este modelo para poder utilizarlo en el presente estudio.



**Figura 17.** Jaula para la cría de mosquitos adultos de la especie *Aedes aegypti*. Fuente: NIH Public Access. Author Manuscript [Clemons et al., 2010].

**ANEXO D.**

Uso de sangre de vaca o cerdo en embutido para la alimentación hematófaga de mosquitos adultos y otros insectos de interés sanitario.



hematófaga de  
a, UNA Costa

**ANEXO E.**

Procedimiento operativo estándar para la colecta de campo de huevos de *Aedes aegypti*.





<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR PARA LA COLECTA DE HUEVOS Y LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> (DIPTERA: CULICIDAE) EN EL DISTRITO CENTRAL, FRANCISCO MORAZÁN</b>		<b>Página 1/4</b>
Elaborado por: Lic. David Martínez Colindres Primera versión Supervisado por: Ada Zelaya  Fecha: ___/___/___ Firma _____	Aprobado por: Eduardo Fernández Cerna  Fecha: ___/___/___  Firma _____	
<p>Los huevos de <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae) colectados a través de ovitrampas ubicadas en las localidades seleccionadas para el estudio, servirán para establecer la población de estudio para los bioensayos. Las larvas colectadas de la misma especie, servirán para confirmar la presencia de la especie en las localidades de colecta y para confirmar la clasificación de las larvas que eclosionen de los huevos colectados.</p> <p><b>Antes de iniciar la colecta:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Seleccionar de antemano los sitios o localidades en donde se realizarán las colectas.</li> <li>2. Seleccionar las manzanas, cuadras o viviendas en donde realizará la colecta en dichas localidades.</li> <li>3. Asegurarse de contar con el material necesario para la colecta.</li> <li>4. Contar con una unidad GPS para poder referenciar geográficamente los sitios de colecta.</li> </ol> <p><b>Materiales para la colecta de huevos:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Recipientes plásticos de color negro con capacidad de entre 800 y 1000 ml.</li> <li>2. Papel absorbente o papel filtro (puede usarse el papel filtro utilizado en las percoladoras de café).</li> <li>3. Bolsas plásticas Ziploc.</li> <li>4. Etiquetas adhesivas.</li> <li>5. Marcador de tinta indeleble.</li> <li>6. Lupa.</li> <li>7. GPS.</li> </ol>		

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR  
PARA LA COLECTA DE HUEVOS Y LARVAS DE *Aedes aegypti*  
(DIPTERA: CULICIDAE) EN EL DISTRITO CENTRAL, FRANCISCO  
MORAZÁN**

**Página  
2/4**

**Materiales para la colecta de larvas:**

1. Succionador de plástico con bulbo de goma (pueden usarse también pipetas plásticas Pasteur, goteros o cucharones soperos).
2. Recipientes plásticos de color blanco de diversos tamaños (son útiles las cajas de toallas húmedas, botes pequeños de yogurt, gelatina, ice cream, etc.).
3. Lupa.
4. Botellas plásticas de refresco sin tapadera.
5. Gaza.
6. Bandas de hule.
7. Marcador de tinta indeleble.
8. GPS.

**Durante la colecta de huevos:**

1. Llenar cada ovitrampa con agua hasta una tercera parte del volumen total del recipiente (el agua puede provenir directamente del suministro de agua en la vivienda, de un barril o de la pila).
2. Colocar el papel absorbente o papel filtro dentro de cada ovitrampa. El papel deberá humedecerse previamente para que pueda adherirse a la pared interna de la ovitrampa, esto brindará una mayor superficie para la puesta de los huevos.
3. Colocar dos ovitrampas en los exteriores de cada vivienda (frente de la vivienda, patio lateral, patio trasero, jardín, azotea, etc.).
4. Colocar las ovitrampas detrás de macetas, barriles, pilas o cualquier sitio sombreado, oscuro y libre de agua de lluvia (para evitar que la ovitrampa se inunde). Si hay posibilidad de que el agua de lluvia alcance la ovitrampa, se deben perforar unos pequeños agujeros en la superficie de la misma (antes de colocar el papel absorbente o papel filtro) a manera de desagüe.
5. Todas las ovitrampas se colocarán a una altura de 0 a 0.60 m del nivel del suelo.
6. En la medida de lo posible, las ovitrampas deben ubicarse fuera del alcance de niños o animales domésticos.

<p style="text-align: center;"><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR PARA LA COLECTA DE HUEVOS Y LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> (DIPTERA: CULICIDAE) EN EL DISTRITO CENTRAL, FRANCISCO MORAZÁN</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>Página 3/4</b></p>
<p>7. Una vez colocada la ovitrampa, adherirle una etiqueta que contenga los siguientes datos: nombre de la localidad muestreada, número de la vivienda muestreada, número de la ovitrampa, fecha en la que fue colocada y la fecha en la que fue retirada.</p> <p>8. Se deberán anotar estos datos en una libreta utilizada como bitácora de campo, en la cual se podrán anotar además otros datos pertinentes (número codificado de las viviendas muestreadas, nombre de los colectores, hora de colecta, etc.).</p> <p>9. Se recomienda que las ovitrampas sean instaladas en todas las viviendas de una localidad dentro de la misma semana.</p> <p>10. Revisar las ovitrampas cada 5 o 7 días después de colocadas (tiempo suficiente para la oviposición de hembras grávidas). Si se revisan cada 7 días, siempre debe hacerse en el mismo día.</p> <p>11. Lavar el recipiente, cambiar el agua y el papel absorbente o papel filtro en cada revisión.</p> <p>12. En el caso de encontrarse durante una inspección, una ovitrampa sin agua, removida de su sitio o volteada, se llenará nuevamente, será reubicada y no contará para esa visita.</p> <p>13. Retirar con cuidado el papel con huevos y colocarlo en una bolsa plástica Ziploc.</p> <p>14. Rotular la bolsa con el número de ovitrampa utilizando un marcador de tinta indeleble.</p> <p>15. Tomar las coordenadas geográficas y anotarlas en la libreta de campo.</p> <p>16. Transportar al laboratorio o área de trabajo.</p> <p>17. Las ovitrampas deberán ser mantenidas en cada punto por un periodo de 1 a 3 semanas hasta conseguir un 40% de ovitrampas positivas con huevos viables.</p>	

<p style="text-align: center;"><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR PARA LA COLECTA DE HUEVOS Y LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> (DIPTERA: CULICIDAE) EN EL DISTRITO CENTRAL, FRANCISCO MORAZÁN</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>Página 4/4</b></p>
<p><b>Durante la colecta de larvas:</b></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Colectar todas las larvas posibles encontradas en recipientes ubicados en el exterior de las viviendas (bases de macetas, pilas, barriles, latas, llantas, bebederos de animales, etc.) utilizando un succionador de plástico con bulbo de goma, gotero, pipeta plástica Pasteur, o cucharon soperero.</li><li>2. Colocar las larvas en un recipiente plástico de color blanco para poder observarlas y asegurarse que corresponden con larvas de mosquito (se deberán colectar todas las especies de mosquitos encontradas, no solo de <i>Aedes aegypti</i>, ya que esto permitirá tener una idea de las especies circulantes en la zona).</li><li>3. Pasar las larvas a botellas plásticas de refresco previamente lavadas.</li><li>4. Cubrir el pico de cada botella con una pieza de gaza.</li><li>5. Sujetar la gaza alrededor del pico de la botella plástica con bandas de hule.</li><li>6. Escribir en las botellas el nombre de la localidad en donde se colectaron las larvas utilizando un marcador de tinta indeleble.</li><li>7. Escribir los mismos datos en la libreta de campo, además de otros datos que crea pertinentes.</li><li>8. Transportar las botellas con las larvas al laboratorio (área de trabajo).</li></ol>	

**ANEXO F.**

Procedimiento operativo estándar para la cría en cautiverio de *Aedes aegypti*.



<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR          PARA LA CRÍA Y MANTENIMIENTO DE MOSQUITOS <i>Aedes aegypti</i>          (DIPTERA: CULICIDAE) EN EL INSECTARIO DEL BIOTERIO - UNAH,          TEGUCIGALPA</b>		<b>Página          1/13</b>
Elaborado por: Lic. David Martínez Colindres Primera versión Supervisado por: Dra. Ada Zelaya  Fecha: ___/___/___ Firma _____	Aprobado por: Dr. Eduardo Fernández Cerna  Fecha: ___/___/___  Firma _____	
<p><b>Insectario del Bioterio - UNAH:</b>          Un insectario es un espacio físico destinado y acondicionado para la cría y mantenimiento de ciertas especies de insectos, que en la mayoría de los casos corresponden a especies de interés médico-epidemiológico por su vinculación con enfermedades en humanos. Los procedimientos descritos a continuación describen la metodología empleada para la cría de mosquitos de la especie <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae) en el espacio acondicionado como insectario ubicado en el bioterio de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Tegucigalpa, M.D.C.</p> <p><b>Origen del material biológico del insectario:</b>          Serán mantenidos en el insectario:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. huevos de la especie <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae) procedentes de la cepa Rockefeller (cepa de referencia de <i>Aedes aegypti</i> susceptible a insecticidas, originaria del Caribe en la década de 1930) y huevos de mosquitos de la misma especie colectados a través de ovitrampas ubicadas en localidades seleccionadas para los fines de este estudio.</li> <li>2. Larvas de <i>A. aegypti</i> procedentes tanto de huevos eclosionados de la cepa Rockefeller como de huevos eclosionados de las muestras colectadas en los sitios de colecta.</li> <li>3. Adultos de <i>A. aegypti</i> procedentes de la cría tanto de larvas de la cepa Rockefeller como de larvas resultantes de las muestras (huevos) colectados en el campo.</li> </ol> <p><b>Procesamiento inicial de huevos de la cepa Rockefeller:</b>          Los huevos de la cepa de referencia Rockefeller que obtenga por primera vez (comúnmente proporcionados por un insectario de referencia o una casa comercial) deberán manejarse de la forma siguiente:</p>		

<p style="text-align: center;"><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR PARA LA CRÍA Y MANTENIMIENTO DE MOSQUITOS <i>Aedes aegypti</i> (DIPTERA: CULICIDAE) EN EL INSECTARIO DEL BIOTERIO - UNAH, TEGUCIGALPA</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>Página 2/13</b></p>
<p>1. Guardar los huevos en bolsas Ziploc.</p> <p>2. Con un marcador de tinta indeleble, escribir sobre la bolsa: (a) cepa Rockefeller; y (b) fecha en la que fueron guardados los huevos en la bolsa.</p> <p>3. Guardar la bolsa con los huevos dentro de un recipiente hermético (puede utilizarse una hielera, una caja de plástico, una caja de madera, etc.) en un lugar fresco hasta que se necesite su hidratación.</p> <p><b>Nota:</b> Si los huevos han sido obtenidos por pedido a un insectario de referencia o una casa comercial, estos vendrán embalados y etiquetados de tal forma que no será necesario guardarlos en bolsas plásticas herméticas, por lo que los pasos 1 y 2 podrán omitirse, pero aún deberán ser almacenados en un recipiente hermético.</p> <p><b>Manejo de los huevos obtenidos mediante ovitrampas:</b></p> <p>Los huevos obtenidos mediante ovitrampas colocadas en las localidades de colecta seleccionadas para el estudio, deberán manejarse de la forma siguiente:</p> <p>1. Sacar el papel filtro con huevos de las bolsas Ziploc y colocarlo sobre platos hondos de foam hasta que el papel filtro este seco. Puede acelerar el secado el colocar un ventilador (esto puede tardar un día o dos).</p> <p>2. Si al terminar el día el papel filtro con huevos no se ha secado, coloque este dentro de un recipiente hermético (como los listados arriba) y vuelva a sacarlos al día siguiente. Esto evitará que los huevos sean dañados por hormigas u otros insectos.</p> <p>3. Una vez secos, guarde nuevamente el papel filtro con huevos en bolsas Ziploc (puede ser la misma bolsa en la que los trajo del campo) y almacene estas en un recipiente cerrado hasta que esté listo para hidratarlos.</p> <p><b>Hidratación de los huevos:</b></p> <p>Tanto los huevos de la cepa de referencia Rockefeller, como los huevos procedentes de muestras de campo, deberán ser manejados de la forma siguiente:</p>	

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR  
PARA LA CRÍA Y MANTENIMIENTO DE MOSQUITOS *Aedes aegypti*  
(DIPTERA: CULICIDAE) EN EL INSECTARIO DEL BIOTERIO - UNAH,  
TEGUCIGALPA**

**Página  
3/13**

1. Llene un recipiente plástico hasta un cuarto de su capacidad con agua declorada que servirá como hábitat artificial para las larvas y las pupas una vez eclosionados los huevos. El agua puede ser agua dulce del grifo a la que se le induce la evaporación del cloro mediante aireación con un compresor pequeño de pecera por un periodo de 24 horas.

1. Sacar el papel filtro con huevos de la bolsa que lo contiene, teniendo el cuidado de no perder huevos durante la manipulación. Puede utilizar guantes durante este procedimiento, de esta forma, observará si quedan en su mano algunos huevos.

2. Colocar el papel filtro con huevos dentro de un recipiente plástico con agua declorada, de manera que este flote sobre la superficie del agua. Si usa guantes en el paso anterior y quedan en sus manos algunos huevos, colóquelos directamente sobre el agua o sobre el papel filtro (Figura 1, página 4).

3. Deje el papel filtro en el agua durante unos días (entre dos a cuatro días en promedio) hasta que vea larvas de primer estadio (L1) en el recipiente. Recuerde que *A. aegypti* pasa por cuatro estadios larvales: L1, L2, L3 y L4, tras lo cual aparece el estadio de pupa (última fase acuática) antes de emerger el adulto.

4. Utilice una lupa de mano para confirmar la presencia de larvas L1 en el recipiente.

5. El tiempo de desarrollo de las larvas desde su primer estadio (L1) hasta cuarto estadio (L4), puede tardar entre 7 y 10 días, de acuerdo a las condiciones de temperatura y humedad.

**Nota:** Recuerde que los huevos son traídos del campo en papel filtro húmedo (por que han sido retirados de una ovitrampa) que llega al insectario dentro de bolsas Ziploc, por lo que es necesario secar el papel con los huevos antes de poder trabajar con ellos.

### **Uso de recipientes plásticos para hidratación de huevos:**

1. Los recipientes plásticos utilizados para hidratar los huevos y criar las larvas, pueden ser baldes medianos de ice cream, panas plásticas para guardar alimentos, cajas plásticas de toallitas húmedas, etc., de color blanco para poder observar el desarrollo larval (Figura 2, página 4).



**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR  
PARA LA CRÍA Y MANTENIMIENTO DE MOSQUITOS *Aedes aegypti*  
(DIPTERA: CULICIDAE) EN EL INSECTARIO DEL BIOTERIO - UNAH,  
TEGUCIGALPA**

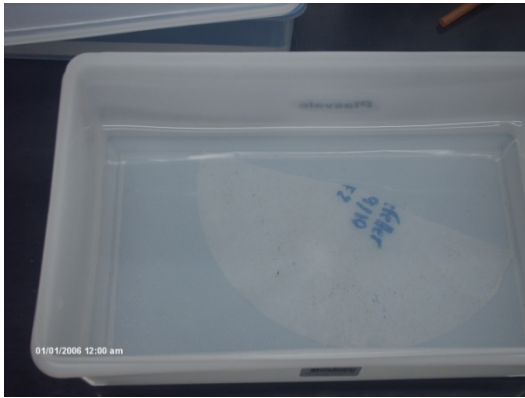


Figura 1. Huevos en hidratación.

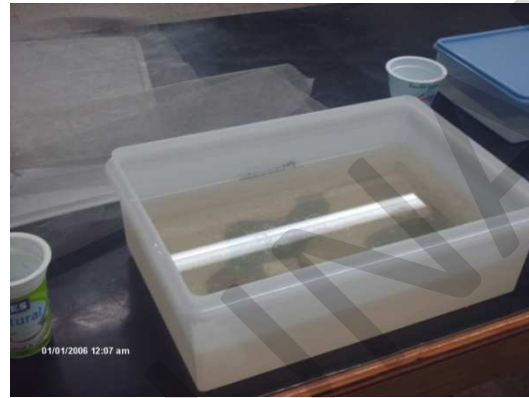


Figura 2. Recipiente plástico.

**Alimentación de las larvas:**

1. Una vez que observe larvas L1, deje pasar un día o dos antes de comenzar a alimentar las larvas.
2. Alimente las larvas con concentrado de conejo o perro molido, o con hígado de res liofilizado. Este último constituye un alimento ideal para las larvas y puede ser obtenido por pedido en casas comerciales de suplementos biológicos.
3. Utilice la medida de un cuarto de una cuchara pequeña del alimento molido cada 2 o 3 días (Figura 3).



Figura 3. Alimentación de larvas

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR  
PARA LA CRÍA Y MANTENIMIENTO DE MOSQUITOS *Aedes aegypti*  
(DIPTERA: CULICIDAE) EN EL INSECTARIO DEL BIOTERIO - UNAH,  
TEGUCIGALPA**

**Página  
5/13**

**Distribución de recipientes con larvas de la cepa Rockefeller y larvas de la cepa de campo:**

Larvas de la cepa Rock:

1. Mantenga suficientes recipientes para la crianza de las larvas de la cepa Rock (el número de recipientes estará en función de las densidades larvales que piense manejar).
2. Etiquete los recipientes que contienen las larvas de la cepa Rock utilizando un marcador indeleble para escribir en un extremo del recipiente un número o código.
3. Ubique los recipientes en un extremo de una mesa o mesón, de manera que sobre espacio para ubicar otros materiales u equipo en ella.
4. Asegúrese de ubicar los recipientes en una sección iluminada del insectario, ya que la cantidad de luz que reciben las larvas es fundamental para su desarrollo.

Larvas de la cepa de campo:

1. Mantenga suficientes recipientes para la crianza de las larvas de la cepa de campo (el número de recipientes estará en función de las densidades larvales que piense manejar).
2. Etiquete los recipientes que contienen las larvas de la cepa de campo utilizando un marcador indeleble para escribir en un extremo del recipiente un número o código.
3. Ubique los recipientes en un extremo de una mesa o mesón, de manera que sobre espacio para ubicar otros materiales u equipo en ella.
4. Asegúrese de ubicar los recipientes en una sección iluminada del insectario, ya que la cantidad de luz que reciben las larvas es fundamental para su desarrollo.

**Monitoreo del desarrollo de las larvas:**

El crecimiento de las larvas es diario, por lo que debe mantener un monitoreo constante sobre las mismas:

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR  
PARA LA CRÍA Y MANTENIMIENTO DE MOSQUITOS *Aedes aegypti*  
(DIPTERA: CULICIDAE) EN EL INSECTARIO DEL BIOTERIO - UNAH,  
TEGUCIGALPA**

**Página  
6/13**

1. Revise varias veces durante el día cada recipiente con larvas (tanto recipientes con la cepa Rock como recipientes con la cepa de campo).
2. Retire las exhubias (mudas de piel) de las larvas de cada recipiente para no saturar el agua con materia orgánica.
3. Anote cada día en la bitácora de trabajo, que estadios y sus fases presentan las larvas en cada recipiente (cepa Rock, cepa de campo), de tal forma que pueda determinar el tiempo promedio que tarda una larva en cambiar de estadio.
4. Alimente las larvas con hígado de res liofilizado cada 2 o 3 días según sea el caso.

**Nota:** Las fases de cada uno de los cuatro estadios larvales (L1, L2, L3 y L4) se determinan estimando el tamaño de una larva en relación a las demás larvas en el recipiente, y se describen como: (a) fase temprana; y (b) fase tardía. Se omite una fase intermedia por carecer de valor práctico.

### **Manejo de pupas:**

El estadio de pupa es el último estadio acuático antes de emerger el adulto volador. En este estadio el mosquito no se alimenta aunque también permanece en el agua junto con las larvas. Para manejar las pupas siga las siguientes indicaciones:

1. Al revisar a diario los recipientes con larvas, fíjese si hay pupas en ese recipiente.
2. Si hay pupas, retírelas de ese recipiente una a una utilizando un capturador manual (Figura 4) o un colador pequeño y colóquelas en un vaso plástico que contenga agua del mismo recipiente en el que estaba la pupa (Figura 5).
3. Cuente el número de pupas que traslada a cada vaso. Anote en la bitácora.
4. Coloque el vaso con pupas en una jaula para mosquitos adultos (Figura 6). Anote en la bitácora la cantidad de vasos con pupas en esa jaula y el número de la jaula.

**Nota:** Asegúrese que no queden pupas en los recipientes con larvas.

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR  
PARA LA CRÍA Y MANTENIMIENTO DE MOSQUITOS *Aedes aegypti*  
(DIPTERA: CULICIDAE) EN EL INSECTARIO DEL BIOTERIO - UNAH,  
TEGUCIGALPA**

**Página  
7/13**



Figura 4. Capturador



Figura 5. Vasos con pupas



Figura 6. Colocando vasos con pupas en jaulas para mosquitos adultos

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR  
PARA LA CRÍA Y MANTENIMIENTO DE MOSQUITOS *Aedes aegypti*  
(DIPTERA: CULICIDAE) EN EL INSECTARIO DEL BIOTERIO - UNAH,  
TEGUCIGALPA**

**Página  
8/13**

### **Mosquitos adultos:**

Una vez que las pupas han completado su ciclo vital (entre 2 y 3 días), surgen los mosquitos adultos. Para evitar fugas de mosquitos adultos, asegúrese de sacar todas las pupas que encuentre en los recipientes con larvas y colóquelos en vasos con agua declorada dentro de las jaulas para adultos. De no hacer lo anterior, pueden ocurrir fugas de mosquitos que alcancen su adultez en los recipientes con larvas.

1. Una vez emergidos los mosquitos adultos dentro de las jaulas, coloque un algodón embebido en una solución azucarada (solución azucarada al 15%) sobre un bote o vaso. Tanto hembras como machos de *A. aegypti* se alimentan de carbohidratos los primeros dos días desde haber emergido de la pupa.
2. Cambié el algodón azucarado cada vez que este se seque para asegurar la alimentación de los machos. Los machos a diferencia de las hembras, no consumen sangre, por lo que se deben alimentar siempre con compuestos azucarados.
3. Al segundo día de haber emergido los adultos, alimente las hembras con sangre, para lo cual puede utilizar una bolsita hecha con intestino de res o cerdo deshidratado previamente en sal y llena con suficiente sangre fresca o conservada en anticoagulante (Figura 7). Utilizar guantes y jeringas en este punto.
4. Alimente con sangre cada 2 o 3 días cada jaula con hembras adultas.
5. Escriba en el centro de un papel filtro la fecha (dd/mm/aa) y el número de la jaula en donde lo va a colocar utilizando un lápiz de tinta indeleble (Figura 8).
6. Humedezca el papel filtro con agua y colóquelo en un plato hondo de foam, de tal manera que el papel filtro cubra las paredes del plato (Figura 9).
7. Llene con agua (del grifo o destilada) hasta la mitad el plato con el papel filtro y colóquelo dentro de una jaula para mosquitos adultos (Figura 10).

**Nota:** El papel filtro humedecido servirá como sustrato para los huevos una vez que las hembras estén listas para oviponer. Las hembras de *A. aegypti* ponen huevos sobre la superficie del agua, no en el agua.

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR  
PARA LA CRÍA Y MANTENIMIENTO DE MOSQUITOS *Aedes aegypti*  
(DIPTERA: CULICIDAE) EN EL INSECTARIO DEL BIOTERIO - UNAH,  
TEGUCIGALPA**

**Página  
9/13**



Figura 7. Intestino con sangre



Figura 8. Etiquetado de papel filtro



Figura 9. Papel filtro en plato hondo de foam



Figura 10. Plato en jaula para adultos

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR  
PARA LA CRÍA Y MANTENIMIENTO DE MOSQUITOS *Aedes aegypti*  
(DIPTERA: CULICIDAE) EN EL INSECTARIO DEL BIOTERIO - UNAH,  
TEGUCIGALPA**

**Página  
10/13**

**Recuperación de huevos de las jaulas para adultos:**

1. Retire el plato de foam de cada jaula cuando vea que hay huevos depositados sobre el papel filtro (Figura 11). Los huevos pueden verse fácilmente ya que son de color oscuro (negro).
2. Al sacar el papel filtro con huevos, si este está húmedo, colóquelo en una caja cerrada (puede ser una caja de foam) hasta que esté totalmente seco. Una vez seco, guárdelo en una bolsa Ziploc a la que le escribirá con un marcador indeleble la fecha en la que fue puesto el papel filtro y la fecha en la que fue retirado de la jaula (Figura 12.)
3. Guarde el papel filtro seco dentro de la bolsa Ziploc en un recipiente hermético hasta que necesite hidratar los huevos.

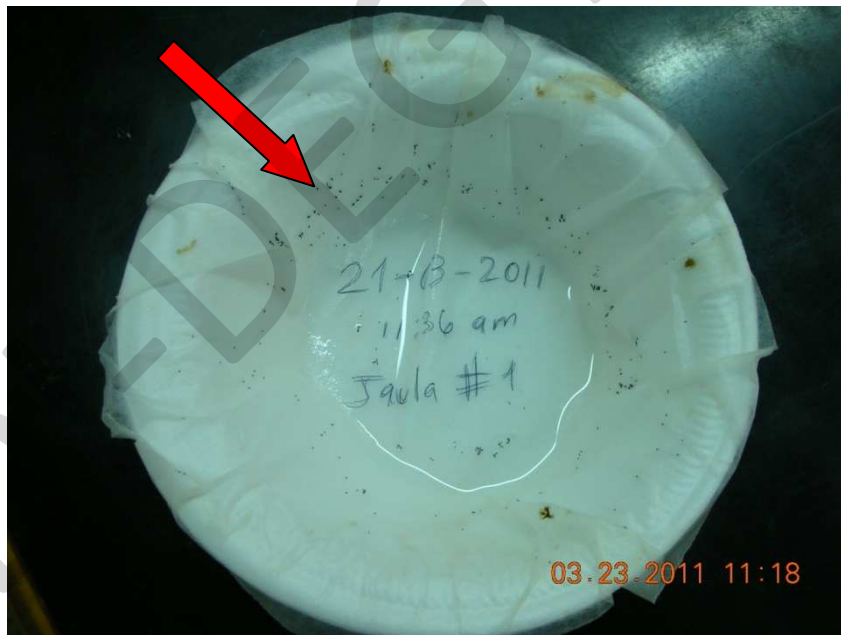


Figura 11. Papel filtro húmedo con huevos de *A. aegypti*

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR  
PARA LA CRÍA Y MANTENIMIENTO DE MOSQUITOS *Aedes aegypti*  
(DIPTERA: CULICIDAE) EN EL INSECTARIO DEL BIOTERIO - UNAH,  
TEGUCIGALPA**

**Página  
11/13**



Figura 12. Etiquetado de bolsa Ziploc antes de ser guardada con huevos de *A. aegypti*

**Consideraciones de bioseguridad:**

Tomar las siguientes consideraciones de bioseguridad durante la crianza en cautiverio de mosquitos de la especie *A. aegypti*:

1. Solo el investigador principal del estudio o su asistente (en caso de ser necesario), tendrán acceso a la manipulación del instrumental de laboratorio, equipo o material biológico disponible para la cría de los mosquitos y los bioensayos.



<p style="text-align: center;"><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR PARA LA CRÍA Y MANTENIMIENTO DE MOSQUITOS <i>Aedes aegypti</i> (DIPTERA: CULICIDAE) EN EL INSECTARIO DEL BIOTERIO - UNAH, TEGUCIGALPA</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>Página 12/13</b></p>
<p>2. Las jaulas (baldes plásticos) en las que permanecerán los mosquitos adultos, serán manipuladas únicamente por el investigador principal y su asistente.</p> <p>3. Se debe utilizar gabacha manga larga para evitar en caso de fuga, la picadura de los mosquitos sobre la piel.</p> <p>4. No se deberá poner en contacto ningún material del insectario (jaulas, bandejas para larvas, coladores) con el insecticida químico a utilizar.</p> <p>5. Se deberá realizar lavado de las manos antes de manipular las larvas o los recipientes que las contengan, para evitar introducir elementos extraños y fuentes de contaminación para estas (sobre todo con la cepa de referencia).</p> <p>6. No se permitirá el acceso de personas con síntomas de gripe o dengue al área de trabajo.</p> <p>7. Se evitará la fuga de mosquitos por las siguientes vías: (1) Las ventanas en el área de trabajo están cerradas con una malla de punto fino que evita la entrada y salida de insectos al interior; (2) Los baldes plásticos que contienen los mosquitos adultos (con capacidad de vuelo) están cubiertos con una doble malla de fibra de vidrio que permite a su vez la visualización al interior de los baldes; (3) La manipulación de los baldes plásticos que contienen los mosquitos adultos estará a cargo únicamente del investigador principal o un ayudante capacitado para dichas tareas.</p> <p>8. En caso de fuga, se cerrará el cubículo de trabajo por 12 horas sin permitir el acceso de personas y se eliminarán los mosquitos que hayan escapado fuera de los baldes de cría mediante un insecticida de bajo impacto o por destrucción manual de cada mosquito.</p> <p>9. Se colocará un rótulo en la entrada del insectario indicando que este especie se lleva a cabo la crianza de mosquitos y que el acceso es restringido.</p>	

<p style="text-align: center;"><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR PARA LA CRÍA Y MANTENIMIENTO DE MOSQUITOS <i>Aedes aegypti</i> (DIPTERA: CULICIDAE) EN EL INSECTARIO DEL BIOTERIO - UNAH, TEGUCIGALPA</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>Página 13/13</b></p>
<p><u>Manejo de guantes descartables y jeringas con sangre de animal:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Se utilizarán guantes de látex para evitar el contacto directo con la sangre de origen animal utilizada para la alimentación de mosquitos adultos. Los guantes serán descartados en bolsas de seguridad y esterilizados en autoclave antes de desecharse de forma definitiva.</li> <li>2. Se utilizarán jeringas para pasar sangre de animal de viales con anticoagulante a beakers o vasos plásticos que contendrán dicha sangre hasta ser vaciada en porciones de intestino deshidratado de res o cerdo para la alimentación de mosquitos adultos. Las agujas serán descartadas en un envase plástico grueso lleno hasta la mitad con una solución de cloro al 5%. En ningún momento la aguja será tapada con el cobertor.</li> <li>3. La porción plástica de la jeringa será colocada en una bolsa de seguridad para posteriormente ser esterilizada en el autoclave antes de descartarse de forma definitiva.</li> </ol> <p><u>Manejo de restos de intestino de res utilizado en la alimentación de adultos:</u></p> <p>El intestino de res o cerdo junto con la sangre no utilizada después de alimentar los mosquitos adultos será descartado en bolsas de seguridad para restos biológicos para posteriormente ser esterilizados en el autoclave.</p> <p><u>Esterilización de materiales de vidrio con restos de sangre de animal:</u></p> <p>Todo material de vidrio utilizado en la preparación del intestino con sangre de animal será esterilizado depositando estos utensilios en una solución de cloro al 1% por al menos 30 minutos. Desinfectar posteriormente en autoclave.</p>	

**ANEXO G.**

Procedimiento operativo estándar para la elaboración de soluciones de temefós (Abate).



<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR PARA LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DEL PESTICIDA TEMEFÓS (ABATE) LABORATORIO TEASDALE CORTI</b>		<b>Página 1/9</b>
Elaborado por: Lic. David Martínez Colindres Primera versión Supervisado por: Dra. Ada Zelaya Fecha: ___/___/___ Firma _____	Aprobado por: Dr. Eduardo Fernández Cerna Fecha: ___/___/___ Firma _____	
<p><b>Antes de comenzar a trabajar:</b></p> <p>Al trabajar con un pesticida organofosforado como temefós (Abate), la preparación de diferentes concentraciones a partir de una solución stock de dicho pesticida, <b><u>debe realizarse</u></b> en una campana de extracción de gases. Toda persona que utilice la campana de extracción de gases debe usar el equipo de protección personal (gabacha manga larga, zapatos cerrados, guantes y mascarilla si el procedimiento lo requiere).</p> <p><b>Para trabajar en la Campana de Extracción de Gases, Laboratorio Teasdale-Corti:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Esta campana debe estar adecuadamente ventilada hacia el exterior.</li> <li>2. No almacene solventes y ácidos en el mismo gabinete (gabinete de la campana).</li> <li>3. En este gabinete solamente se permite el almacenamiento de ácidos.</li> <li>4. No bloquee la puerta del gabinete.</li> <li>5. Limpie inmediatamente los derrames dentro de la campana y el gabinete.</li> </ol> <p><b>Datos del insecticida adquirido:</b></p> <p>Para este estudio se adquirió un frasco de 100 mg de temefós (Abate) en grado técnico de 97.5% de pureza. El temefós (Abate) grado técnico comercial puede adquirirse en concentraciones de entre 90% hasta 98% de pureza, dependiendo de la casa comercial que surta el producto y de las especificaciones dadas por el investigador.</p>		

<p style="text-align: center;"><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR PARA LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DEL PESTICIDA TEMEFÓS (ABATE) LABORATORIO TEASDALE CORTI</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>Página 2/9</b></p>
<p><b>Preparación de una solución stock a partir de la formulación comercial de temefós (Abate):</b></p> <p>Se preparará una solución stock tomando 25.64 mg de temefós (Abate) al 97.5% en 50 ml de alcohol etílico al 99% de pureza (disolvente). Esta solución estará a una razón de 1: 2 (una parte del insecticida en dos partes del disolvente). La concentración final de la solución stock será de 500 µg/ml o 500 ppm (ver diagrama en la página 7).</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Preparar un balón de fondo plano o un matraz de Erlenmeyer de 50 ml.</li> <li>2. Pesar 25.64 mg de temefós (Abate) al 97.5% de pureza.</li> <li>3. Colocar los 25 mg de temefós (Abate) dentro del balón de fondo plano.</li> <li>4. Preparar alcohol etílico al 99%.</li> <li>5. Aforar hasta 50 ml con el alcohol en el balón que contiene 25.64 mg de temefós.</li> </ol> <p><b>Preparación de concentraciones de temefós (Abate) a partir de una solución stock de 500 µg/ml:</b></p> <p>Se prepararán cinco concentraciones de temefós (Abate) a partir de una solución stock de 500 µg/ml, tomando cinco alícuotas de dicha solución. Las concentraciones a preparar serán: 0.024 µg/ml; 0.012 µg/ml; 0.006 µg/ml; 0.003 µg/ml y 0.0015 µg/ml (ver diagrama en la página 8).</p> <p><u>Preparación de una solución de 0.024 µg/ml:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Preparar un balón de fondo plano con capacidad de 1000 ml y un balón de fondo plano con capacidad de 100 ml.</li> <li>2. Tomar una alícuota de 4.8 ml de la solución stock con una micro pipeta o pipeta volumétrica con capacidad de 5 ml.</li> <li>3. Verter dicha alícuota en un balón de 1000 ml.</li> <li>4. Aforar hasta 1000 ml con alcohol etílico al 99%.</li> </ol>	

<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR PARA LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DEL PESTICIDA TEMEFÓS (ABATE) LABORATORIO TEASDALE CORTI</b>	<b>Página 3/9</b>
<p>5. Tomar una alícuota de 1 ml del balón de 1000 ml con una micro pipeta o pipeta volumétrica con capacidad de 1 ml.</p> <p>6. Verter dicha alícuota en un balón de 100 ml.</p> <p>7. Aforar hasta 100 ml con alcohol etílico al 99%.</p> <p><u>Preparación de una solución de 0.012 µg/ml:</u></p> <p>1. Preparar un balón de fondo plano con capacidad de 1000 ml y un balón de fondo plano con capacidad de 100 ml.</p> <p>2. Tomar una alícuota de 2.4 ml de la solución stock con una micro pipeta o pipeta volumétrica con capacidad de 5 ml.</p> <p>3. Verter dicha alícuota en un balón de 1000 ml.</p> <p>4. Aforar hasta 1000 ml con alcohol etílico al 99%.</p> <p>5. Tomar una alícuota de 1 ml del balón de 1000 ml con una micro pipeta o pipeta volumétrica con capacidad de 1 ml.</p> <p>6. Verter dicha alícuota en un balón de 100 ml.</p> <p>7. Aforar hasta 100 ml con alcohol etílico al 99%.</p> <p><u>Preparación de una solución de 0.006 µg/ml:</u></p> <p>1. Preparar un balón de fondo plano con capacidad de 1000 ml y un balón de fondo plano con capacidad de 100 ml.</p> <p>2. Tomar una alícuota de 1.2 ml de la solución stock con una micro pipeta o pipeta volumétrica con capacidad de 5 ml.</p> <p>3. Verter dicha alícuota en un balón de 1000 ml.</p> <p>4. Aforar hasta 1000 ml con alcohol etílico al 99%.</p> <p>5. Tomar una alícuota de 1 ml del balón de 1000 ml con una micro pipeta o pipeta volumétrica con capacidad de 1 ml.</p> <p>6. Verter dicha alícuota en un balón de 100 ml.</p>	

<p style="text-align: center;"><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR PARA LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DEL PESTICIDA TEMEFÓS (ABATE) LABORATORIO TEASDALE CORTI</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>Página 4/9</b></p>
<p>7. Aforar hasta 100 ml con alcohol etílico al 99%.</p> <p><u>Preparación de una solución de 0.003 µg/ml:</u></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Preparar un balón de fondo plano con capacidad de 1000 ml y un balón de fondo plano con capacidad de 100 ml.</li><li>2. Tomar una alícuota de 0.6 ml de la solución stock con una micro pipeta o pipeta volumétrica con capacidad de 5 ml.</li><li>3. Verter dicha alícuota en un balón de 1000 ml.</li><li>4. Aforar hasta 1000 ml con alcohol etílico al 99%.</li><li>5. Tomar una alícuota de 1 ml del balón de 1000 ml con una micro pipeta o pipeta volumétrica con capacidad de 1 ml.</li><li>6. Verter dicha alícuota en un balón de 100 ml.</li><li>7. Aforar hasta 100 ml con alcohol etílico al 99%.</li></ol> <p><u>Preparación de una solución de 0.0015 µg/ml:</u></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Preparar un balón de fondo plano con capacidad de 1000 ml y un balón de fondo plano con capacidad de 100 ml.</li><li>2. Tomar una alícuota de 0.3 ml de la solución stock con una micro pipeta o pipeta volumétrica con capacidad de 5 ml.</li><li>3. Verter dicha alícuota en un balón de 1000 ml.</li><li>4. Aforar hasta 1000 ml con alcohol etílico al 99%.</li><li>5. Tomar una alícuota de 1 ml del balón de 1000 ml con una micro pipeta o pipeta volumétrica con capacidad de 1 ml.</li><li>6. Verter dicha alícuota en un balón de 100 ml.</li><li>7. Aforar hasta 100 ml con alcohol etílico al 99%.</li></ol>	

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR  
PARA LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DEL PESTICIDA TEMEFÓS  
(ABATE)  
LABORATORIO TEASDALE CORTI**

**Página  
5/9**

### **Consideraciones de bioseguridad:**

#### Manipulación y almacenamiento de temefós (Abate):

1. Este producto químico debe ser manipulado únicamente en una campana de extracción de gases.
2. Debe evitarse el contacto directo con la piel, ojos y prendas de vestir.
3. Debe evitarse además su ingestión e inhalación.
4. Se deben lavar muy bien las manos después de su manipulación.
5. Almacenar bajo refrigeración.
6. Almacenar únicamente con productos químicos compatibles.
7. Mantener fuertemente tapados tanto los frascos como los recipientes (matraz de Erlenmeyer o balón de fondo plano) que contienen insecticida.

#### Equipo de protección personal:

Al manipular temefós (Abate) grado técnico o concentraciones diluidas, se debe utilizar siempre el siguiente equipo de protección personal:

1. Utilizar anteojos de seguridad.
2. Utilizar guantes.
3. Utilizar gabacha y zapatos cerrados.

El uso de guantes, gabacha y zapatos cerrados reduce la posibilidad de sufrir daños en la piel por contacto accidental.



**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR  
PARA LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DEL PESTICIDA TEMEFÓS  
(ABATE)  
LABORATORIO TEASDALE CORTI**

**Página  
6/9**

Protección personal adicional:

Respirador de filtro P3 contra partículas tóxicas (no disponible).

Derrames y fugas:

En caso de ocurrir un derrame durante la manipulación de este producto, siga las siguientes recomendaciones:

1. No verter el producto al alcantarillado.
2. Barrer la sustancia derramada e introducirla en un recipiente con tapón hermético.
3. Recoger cuidadosamente el residuo y trasladarlo a continuación a un lugar seguro.

Primeros auxilios:

1. En caso de contacto con los ojos, enjuagar con agua de forma continua de 15 a 20 minutos.
2. En caso de contacto con la piel, quite las prendas de vestir contaminadas y enjuague con suficiente agua durante 15 o 20 minutos. Si no hay quemadura, utilizar jabón para limpiar la piel.
3. En caso de inhalación, sacar al afectado del laboratorio y llevarlo a un lugar ventilado donde pueda reposar. De ser necesario llevar al paciente al hospital para aplicar oxígeno y tratar posibles complicaciones.
4. En caso de ingestión, enjuague la boca del afectado con suficiente agua y proporcione de inmediato asistencia médica.

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR  
PARA LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DEL PESTICIDA TEMEFÓS  
(ABATE)  
LABORATORIO TEASDALE CORTI**

**Página  
7/9**

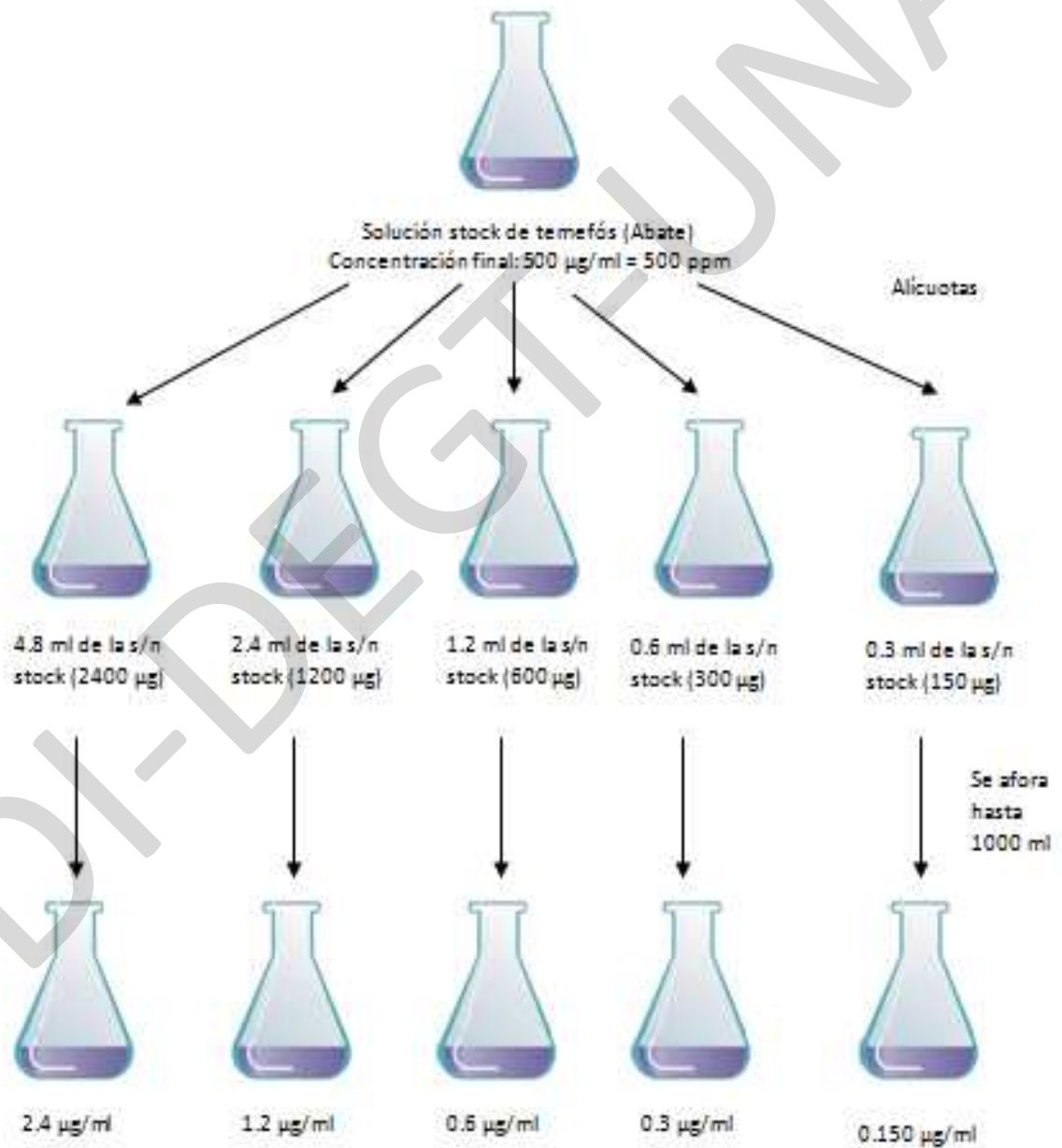
**Diagrama resumen:**



NOTA: 1 mg = 1000 µg

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR  
PARA LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DEL PESTICIDA TEMEFÓS  
(ABATE)  
LABORATORIO TEASDALE CORTI**

**Diagrama resumen:**



**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR  
PARA LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DEL PESTICIDA TEMEFÓS  
(ABATE)  
LABORATORIO TEASDALE CORTI**

**Página  
9/9**

