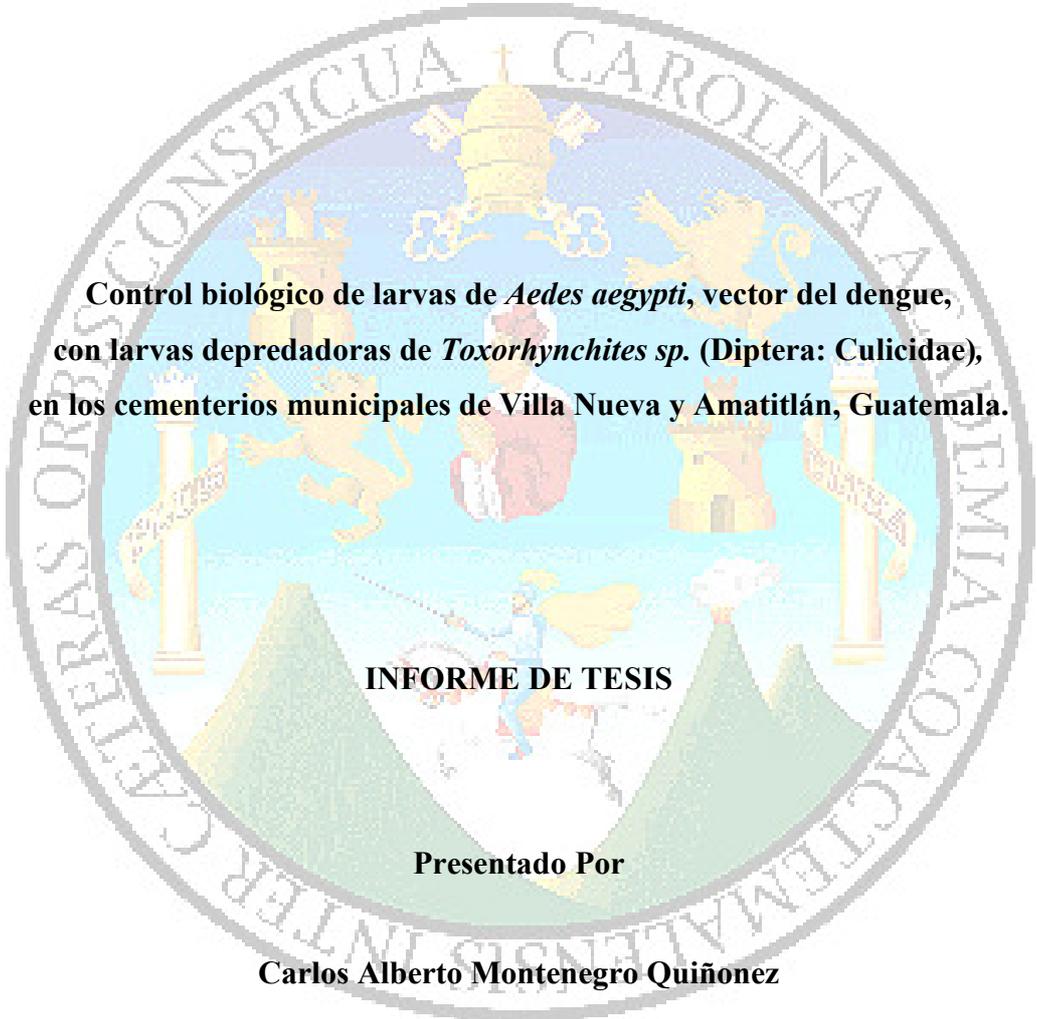


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the Universidad de San Carlos de Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a man in a red robe, likely a saint or scholar, holding a book. Above him is a golden dome with a cross. The seal is surrounded by a Latin inscription: "ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CETERAS ORBIS CONSPICUA CAROLINA".

**Control biológico de larvas de *Aedes aegypti*, vector del dengue,
con larvas depredadoras de *Toxorhynchites sp.* (Diptera: Culicidae),
en los cementerios municipales de Villa Nueva y Amatitlán, Guatemala.**

INFORME DE TESIS

Presentado Por

Carlos Alberto Montenegro Quiñonez

Para optar al título de

Biólogo

Guatemala, Agosto de 2008

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph. D.

DECANO

Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto

SECRETARIO

Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M. A.

VOCAL I

Licda. Liliana Vides de Urizar

VOCAL II

Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez

VOCAL III

Br. Andrea Alejandra Alvarado Álvarez

VOCAL IV

Br. Anibal Rodrigo Sevillanos Cambronero

VOCAL V

DEDICATORIA

A las dos personas más importantes de mi vida, con las que he logrado tener un amor tan puro e inigualable, mi esposa y mi hijo. Gracias realmente gracias.

A mi madre que ha luchado tanto por nosotros y por toda su familia y de quien aprendí todos los valores más altos de la humanidad.

A mi padre que siempre ha estado ahí, para ayudarnos y guiarnos en la vida. A quien no se le puede negar el amor que nos ha dado a mis hermanos, a mi y a mi hijo. Y por enseñarnos que la familia es primero.

A mis hermanos Aníbal y Stefanie, de quienes estoy orgulloso y muy feliz de tenerlos como hermanos.

A mi abuela querida Machiqui, que amo tanto y le agradezco todo el tiempo que me ha brindado y el amor que he recibido de ella.

A toda mi familia, mis tíos, tías, primos, primas, hermanos, suegra, suegro (que en paz descansa), cuñadas, a todos, que realmente le agradezco tanto a Dios por la familia tan hermosa a la que me ha hecho pertenecer.

A mi gloriosa universidad de la cual he aprendido tanto y me ha dejado tanto que nunca olvidare los maravillosos años que pase en ella.

A mi país, Guatemala, que amo de verdad y que me duele tener que verlo sufrir tanto.

A mis amigos, más que amigos, mis hermanos a quienes les he brindado, y ellos me han brindado, siempre amistad y espero poder vivir muchas más alegrías con todos ellos.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo quiero agradecerle a Dios, Jesús, la Virgen María y San Judas Tadeo, por que nunca me han abandonado, a mi y a mi familia, y siempre nos han ayudado.

A mi esposa Vivian Monzón y mi hijo Santiago Andrés por ser fuente de inspiración y de gran amor en mi vida. Y por ayudarme a guiar mi vida.

A mi madre Dora Leticia por ser una gran guía en mi vida y un excelente modelo a seguir. A mi padre Luís Alberto por su alegría, comprensión y natural forma de ver la vida. A ambos por todo su amor, cariño, por toda su ayuda ya que sin ellos nada de esto hubiera sido posible y por la libertad con la que me dejaron manejar mi vida.

A mis hermanos Luís Aníbal y Stefanie María por todo su amor y amistad.

A Antonieta Rodas y Carlota Monroy por todo su apoyo, confianza y consejos para mi vida profesional y personal. A Marianela Menes por su amistad y ayuda en el desarrollo de la investigación. A todos los compañeros del laboratorio por compartir conmigo muchas experiencias y alegrías.

A todos los profesores universitarios de los cuales recibí muchas enseñanzas y consejos. Al Dr. Gautam Aditya, por todos sus consejos y comentarios durante el desarrollo de la investigación.

Al personal de la Sección de Entomología del Ministerio de Salud área central, la Sección de Vectores, Guatemala Sur, a la Sección de Servicios Públicos de la Municipalidad de Villa Nueva y todas las personas que participaron en la investigación, por todo su apoyo y ayuda en el desarrollo de la misma.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, por ser la mejor casa de estudios a la cual he pertenecidos y por todas sus enseñanzas la cuales llevare por siempre en mi corazón. Al colegio Liceo Chaperó y sus directores por prepararme para mi carrera universitaria.

A mis compañeros Lester, Roberto Loyo, Jonatan, Nando, Ferran, Edson, Juan, Ghandi, Alex (Pato), Chévere, Mafer, Eli, Cristian, Roberto Garnica, Albina, Tere, Ivonne, Harim, Jessi, Alexis, Naty, a los del club Argos y a todos los que me falta por mencionar, Gracias por su amistad incondicional y por los buenos momentos que hemos vivido.

INDICE

1. Resumen	01
2. Introducción	03
3. Antecedentes	05
3.1. La enfermedad del dengue	05
3.2. <i>Aedes aegypti</i>	07
3.3. Control de <i>Aedes aegypti</i>	10
3.3.1. Control mecánico	11
3.3.2. Control químico	12
3.3.3. Control biológico	13
3.3.3.1. <i>Toxorhynchites sp.</i>	14
3.4. Estudios previos	19
4. Justificación	21
5. Objetivos	23
6. Hipótesis	24
7. Materiales y Métodos	25
7.1. Universo	25
7.1.1. Población	25
7.1.2. Muestra	25
7.2. Métodos	25
7.2.1. Colecta de larvas y pupas de <i>Toxorhynchites sp.</i>	25
7.2.2. Mantenimiento de una colonia de <i>Toxorhynchites sp.</i> en condiciones de laboratorio	26
7.2.3. Mantenimiento de una colonia de <i>Aedes aegypti</i> en condiciones de laboratorio	26
7.2.4. Descripción del ciclo de vida de <i>Toxorhynchites sp.</i> en condiciones de laboratorio	27
7.2.5. Pruebas de laboratorio	28
7.2.5.1. Cálculo del impacto de depredación (PI)	29
7.2.5.2. Cálculo del impacto de aclaración (CR)	29

7.2.6. Fase de campo	30
7.2.6.1. Evaluación de la situación entomológica de <i>Aedes aegypti</i> en los sitios de estudio	30
7.2.6.2. Pruebas de control biológico	32
8. Resultados	34
8.1. Ciclo de vida de <i>Toxorhynchites grandiosus</i> en condiciones de laboratorio	34
8.2. Pruebas de control biológico en condiciones de laboratorio	35
8.2.1. Impacto de depredación y rango de aclaración	37
8.3. Fase de campo	37
8.3.1. Primera evaluación entomológica	37
8.3.2. Pruebas de control biológico	38
8.3.2.1. Cementerio de Villa Nueva	38
8.3.2.2. Cementerio de Amatlán	39
8.3.3. Segunda evaluación entomológica	39
9. Discusión	41
9.1. Selección del agente de control	41
9.2. Selección de los sitios de estudio	41
9.3. Ciclo de vida de <i>Toxorhynchites grandiosus</i> en condiciones de laboratorio	42
9.4. Potencial de <i>Toxorhynchites grandiosus</i> como agente de control biológico	44
9.4.1. Impacto de depredación y rango de aclaración	45
9.5. <i>Toxorhynchites grandiosus</i> como agente de control biológico en condiciones de campo	47
9.5.1. Condiciones adversas a las pruebas de campo realizadas	47
9.5.2. Resultados esperados y resultados obtenidos	48
10. Conclusiones	53
11. Recomendaciones	54
12. Referencias	55
13. Anexos	61

1. RESUMEN

En Guatemala la enfermedad del dengue constituye un problema de considerable magnitud. Las estrategias de control del vector, *Aedes aegypti*, empleadas por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social –MSPAS- han incluido tanto tratamientos mecánicos como químicos. Ambos han probado no ser viables en futuros cercanos debido a problemas técnicos y a la resistencia que genera el vector a los insecticidas; además de los efectos secundarios, no deseados, que estos últimos generan.

Espacios abiertos, como los cementerios, pueden poseer gran cantidad de recipientes o contenedores, con características adecuadas para convertirse en criaderos potenciales del vector; lo cual puede representar un importante problema para el personal del MSPAS.

Un método alternativo de control para estos lugares, puede ser el biológico. Un agente potencial son los mosquitos del género *Toxorhynchites*, debido a que sus larvas son feroces depredadoras de culicidos, entre ellos *Aedes aegypti*, y en la fase adulta las hembras no consumen sangre para su reproducción.

El objetivo del presente estudio fue evaluar tanto en condiciones de laboratorio como de campo, el potencial de *Toxorhynchites grandiosus*, como un método de control biológico del vector del dengue. En la fase de laboratorio se montó una colonia a partir de especímenes colectados en el campo, logrando exitosamente su cultivo bajo condiciones controladas. Las larvas obtenidas se utilizaron para realizar pruebas en las que se midieron índices de depredación y rangos de aclaración. Los resultados mostraron una alta efectividad de las larvas depredadoras sobre las larvas de *Aedes aegypti*, alcanzando índices de hasta un 85% de depredación a medida que iban creciendo, los valores de los ANDEVAS realizados no mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$), concluyendo que *T. grandiosus* es un efectivo agente de control biológico sobre el vector del dengue en condiciones de laboratorio.

En la fase de campo, previo a realizar las pruebas de control en los cementerios municipales de Villa Nueva y Amatitlán, se llevaron a cabo evaluaciones entomológicas para calcular los índices aélicos de cada lugar. Posteriormente, en el primer cementerio se aplicaron directamente larvas de *T. grandiosus* en los nichos que se encontraron positivos en la evaluación. Se cuantificó la reducción de la población del vector por medio de las larvas del agente, promediando una reducción media en el sitio de estudio, los valores de los ANDEVAS, medidos a partir de la depredación entre nichos, no presentaron una diferencia significativa ($P > 0.05$). En el segundo cementerio se realizó una liberación de adultos de *T. grandiosus* esperando que las hembras ovipusieran en los recipientes positivos y las larvas que emergieran redujeran los índices de infestación del vector.

Para medir el efecto del control biológico, en ambos cementerios se realizaron nuevas evaluaciones entomológicas un mes después de aplicado el agente. Los resultados mostraron que aunque no hubo una reducción en los índices, éstos tampoco aumentaron.

2. INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad endemo-epidémica considerada como la enfermedad viral, transmitida por artrópodos, más importante que afecta al hombre. Tiene un amplio espectro que va desde casos inaparentes hasta formas graves (Guzmán *et. al.*, 1999). En Guatemala la enfermedad constituye un problema de considerable magnitud. Para el año 2006 durante el mes de mayo se habían reportado 728 casos de dengue, mientras que en el mismo período durante el 2007, se reportaron 979 casos (Centro Nacional de Epidemiología, 2007).

Para la región de las Américas el vector de la enfermedad es el mosquito *Aedes aegypti*, el cual es principalmente urbano y se encuentra en agua limpia. Esto convierte en criaderos potenciales a muchos recipientes plásticos utilizados para almacenar agua para consumo humano; así como otros recipientes no útiles como las llantas, que pueden convertirse en importantes sitios de cría (Rossi & Almirón, 2004).

En los años 40 y 50, Guatemala, siguiendo las recomendaciones de la OPS, realizó importantes esfuerzos para erradicar al vector, siendo certificada como libre de éste en la XI Reunión del Consejo de Directores de la Organización Mundial de la Salud –OMS- en 1959. A pesar de los esfuerzos para mantener la certificación, el vector reapareció en la ciudad de Escuintla en el año 1967 y sucesivamente se le encontró en diferentes lugares hasta reportarse en gran parte del país (Castillo, 2000).

Los programas habituales de control químico para *Aedes aegypti* resultaron inadecuados e ineficaces; de manera que en 1978 surgió una epidemia de dengue en Escuintla, seguida de muchas más hasta llegar a convertir la enfermedad en recurrente y endémica (Castillo, 2000). Este escenario ha hecho que sea necesario que los programas de vigilancia y control del mosquito incluyan, además del tratamiento con químicos otros tratamientos complementarios.

El control biológico resulta una alternativa bastante llamativa para el control de vectores. Entre sus ventajas, presenta un menor costo y es menos nocivo para el ecosistema y la salud humana. Su principio es utilizar organismos que sean enemigos y reguladores naturales de las poblaciones de vectores (Bay *et. al.*, 1973). Estudios realizados en diferentes países, han mostrado que las larvas de *Toxorhynchites sp* han resultado ser un agente potencial de control biológico para las larvas de *Aedes aegypti* debido a su capacidad depredadora sobre éstas. En Guatemala existe muy poca información disponible con respecto a este género, por lo que es importante realizar estudios para determinar su eficacia, especialmente en espacios abiertos, como los cementerios, los cuales se caracterizan por presentar abundantes criaderos del vector sin vigilancia.

El objetivo del presente estudio fue probar la eficacia de *Toxorhynchites grandiosus* como agente de control biológico, realizando pruebas en condiciones de laboratorio, donde se midió de una manera directa la depredación de éste sobre las larvas de *Aedes aegypti*. Posteriormente se realizaron pruebas de campo que consistieron en la introducción de larvas en criaderos del mosquito vector del dengue y en la liberación de adultos. El efecto del control se midió por medio de los índices entomológicos, que se calcularon, para cada lugar, antes y después de las pruebas.

3. ANTECEDENTES

3.1. La enfermedad del dengue

El dengue es una enfermedad conocida a nivel mundial, a pesar de ser propia de regiones tropicales y subtropicales. Se caracteriza por ser aguda y generalizada. Es producida por un virus del género *Flavivirus* de la familia FLAVIVIRIDAE, representado por cuatro serotipos llamados DEN 1, 2, 3, y 4 (Foster & Walker, 2002). Su principal vector es el mosquito hematófago *Aedes aegypti*; además de otros mosquitos del mismo género (Domínguez, 2000).

Existen dos manifestaciones clínicas del dengue. La primera es la fiebre del dengue o dengue clásico que se caracteriza clínicamente por un cuadro febril con patrón difásico, cefalea, dolores en diferentes partes del cuerpo, postración, exantema, linfadenopatía y leucopenia. El 50% de los pacientes son asintomáticos. Los cuadros clásicos y atípicos no suelen presentar complicaciones y su mortalidad es muy baja. La segunda manifestación es la fiebre hemorrágica, la cual es severa. Se caracteriza por anormalidad en la hemostasia y aumento en la permeabilidad muscular, que en algunos casos puede conducir a choque hipovolémico. La OMS ha designado cuatro diferentes grados, de acuerdo a la severidad de la enfermedad (Domínguez, 2000).

Los primeros datos históricos sobre el dengue mencionan la isla de Java en 1779 y Filadelfia (E.U.A.) en 1780, como los primeros lugares donde se reconocieron brotes de la enfermedad. En América, los relatos sobre esta dolencia datan de más de 200 años. En el siglo antepasado ocurrieron grandes epidemias, coincidiendo con la intensificación del transporte comercial entre los puertos de la región del Caribe y el Sur de los Estados Unidos con el resto del mundo. En el siglo XX la primera epidemia de dengue clásico en América, comprobada en laboratorio, ocurrió en la región del Caribe y en Venezuela entre 1963 y 1964 asociándose al serotipo Den-3. El serotipo Den-4 fue introducido en 1981 y

desde entonces los tipos 1,2 y 4 han sido transmitidos simultáneamente en muchos países donde *Aedes aegypti* está presente (Chiparelli & Schelotto, 1999).

Para la región de las Américas, hasta el 26 de septiembre del 2007 se habían reportado 630,356 casos de fiebre por dengue, 12,147 casos de fiebre por dengue hemorrágico y 183 muertes con una tasa de letalidad del 1.5% (OPS, 2007).

En Guatemala, cifras de principios del milenio, indican que en la semana epidemiológica 40 del año 2000, se notificaron 5,963 casos, lo cual representó un aumento del 85% del número de casos notificados con respecto al mismo período en el año anterior. Durante el año 2002, se reportaron 7, 599 casos clínicos de dengue; de los cuales 47 fueron de dengue hemorrágico y hubo 6 muertes en el país por dengue hemorrágico (Luján *et. al.*, 2004). El MSPAS dentro del Sistema Gerencial de Salud –SIGSA-, reportó que para el año 2006 ocurrieron 3,352 casos de dengue clásico y 5 casos de dengue hemorrágico. Hasta el mes de septiembre del año 2007, Guatemala había reportado 1,628 casos sumando dengue clásico y dengue hemorrágico (OPS, 2007).

En el país, antes de los años noventa, DEN-1 era el único serotipo encontrado circulando, excepto en 1988 cuando los serotipos 1, 2 y 4 fueron aislados. En los últimos años se han encontrado varios de los serotipos circulando simultáneamente (Castillo, 2000).

Las razones de la aparición del dengue como un importante problema de salud mundial y el aumento de la incidencia de casos en América, se atribuyen a varios factores entre los que se encuentran:

- El dengue es una enfermedad principalmente urbana, donde el combate al vector (principal medida de control) depende de la mano de obra y existen dificultades operacionales cuando se intenta poner en juego un plan de control sistemático.
- Urbanización continua y por lo general no planificada;

- Servicios municipales inadecuados, tales como el abastecimiento de agua y la eliminación de residuos sólidos;
- La tasa en aumento y la variedad geográfica de la transmisión vírica debidas a los viajes intercontinentales;
- La circulación de múltiples cepas y serotipos en un área;
- La adaptabilidad de los vectores (el mosquito *Aedes aegypti* y, en menor grado, el mosquito *Aedes albopictus*);
- La producción y el uso no restringido de envases de alimentos y bebidas no biodegradables, barriles y otros recipientes de almacenamiento de agua, que a menudo se convierten en criaderos;
- La reinfestación de la mayor parte de América tropical por *Aedes aegypti*, su resistencia a los insecticidas y la ausencia de una vacuna eficaz para el ser humano;
- La importación de neumáticos viejos o usados por los países en desarrollo;
- Los programas nacionales irregulares, fragmentados o inexistentes (Chiparelli & Schelotto, 1999; Parks & Lloyd, 2004).

3.2. *Aedes aegypti*

Clasificación:

Orden	Diptera
Familia	Culicidae
Subfamilia	Culicinae
Tribu	Aedini
Género	<i>Aedes</i>
Especie	<i>Aedes aegypti</i>

(Foster & Walker, 2002)

Aedes aegypti es un mosquito originario de África, introducido en América a través del tráfico de esclavos. Actualmente es cosmopolita. Es esencialmente doméstico, “no precisamente urbano” y también existen formas silvestres (Rossi & Almirón, 2004).

Su ciclo de vida comprende las etapas de huevo, larva, pupa y adulto (Figura 1). Debido a su relación con el hombre, los sitios de cría consisten principalmente en recipientes artificiales ubicados cerca de las viviendas o dentro de las mismas, siendo muy amplia la gama de posibles criaderos. Es un vector de agua limpia, especialmente de consumo humano, aunque las llantas de vehículos también son importantes sitios de cría, además de encontrarse en depósitos naturales como cavidades de árboles, en bambúes, bromeliáceas y en huecos de rocas (Reyes, 1990; Rossi & Almirón, 2004).

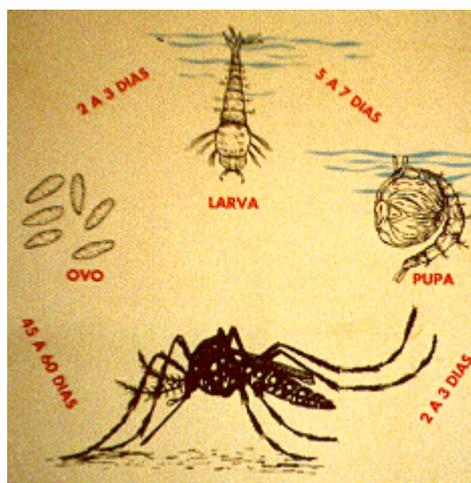


Figura 1: Ciclo de vida de un mosquito normal (Culicido).

Las hembras seleccionan los sitios para oviponer detectando diferencias químicas en el agua de los criaderos, lo cual es posible mediante receptores ubicados en las antenas o espinas, que funcionan como quimiorreceptores en las patas. Prefieren oviponer en lugares resguardados, especialmente donde los huevos pueden adherirse a alguna pared. El desarrollo embrionario, en óptimas condiciones de temperatura y humedad, ocurre en un lapso de dos a tres días; aunque, los huevos son capaces de resistir desecación y

temperaturas extremas, lo cual les permite mantenerse viables de siete a doce meses (Rossi & Almirón, 2004).

El desarrollo larval comprende cuatro estadios conocidos como L-1, L-2, L-3 y L-4 (Reyes, 1990). Las larvas se mueven activamente en el ambiente acuático para buscar alimento que atraen hacia la boca por medio de los cepillos bucales (figura 2). Son fotofóbicas y aún cuando prefieren criaderos con agua limpia, pueden tolerar ambientes con abundante materia orgánica en descomposición. En condiciones óptimas el tiempo de desarrollo larval es de siete a diez días (Rossi & Almirón, 2004). Su hábitat ideal son los contenedores, ya sean artificiales o naturales (Goma, 1966).

Debido a que las larvas de *Aedes aegypti*, poseen una estructura especial para la respiración, llamada sifón (figura 2), la posición que toman cuando se encuentran en reposo en el agua es de un ángulo de aproximadamente 30 grados con respecto a la superficie. Para que las larvas puedan cambiar de estadio tienen que pasar por ecdisis o metamorfosis, rompiendo su exoesqueleto para que partes importantes, como la cabeza y el sifón, de la larva puedan crecer (Goma, 1966).

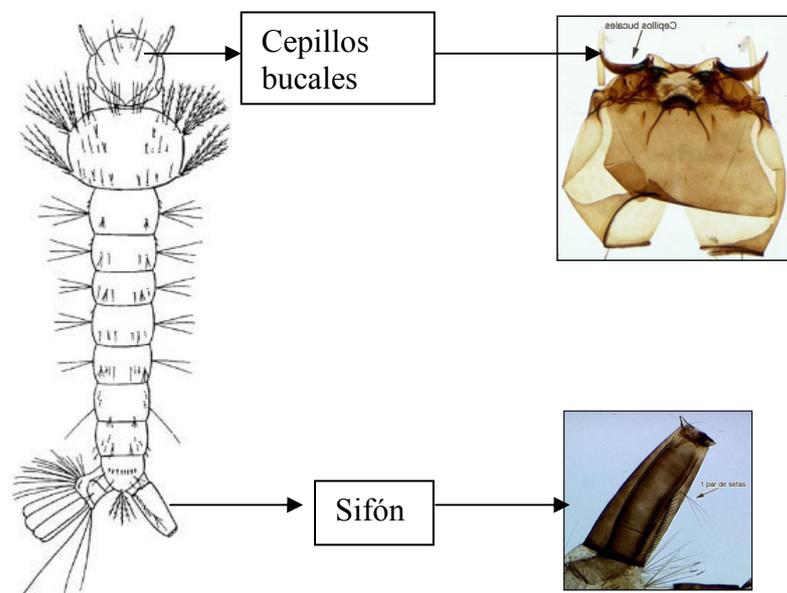


Figura 2: Larva de *Aedes aegypti* donde se observa el sifón y los cepillos bucales.

En la pupa se operan profundas transformaciones que llevan a la formación del adulto. Si bien la pupa se mueve, la tendencia es permanecer inmóvil en contacto con la superficie del agua. También son fotofóbicas. En condiciones favorables, la duración de este estado es de alrededor de dos días (Rossi & Almirón, 2004).

Luego de emerger, los adultos procuran lugares húmedos y sin corrientes de aire donde puedan reposar. Como se trata de mosquitos domésticos y antropofílicos, las hembras obtienen la sangre que necesitan para completar el desarrollo folicular fundamentalmente del hombre. A diferencia de las hembras, los machos no son hematófagos y se alimentan únicamente de néctar o de otros jugos de plantas. La dispersión espontánea o activa de las hembras alcanza los 100 m, por lo que durante su vida visitan pocas residencias, tendiendo a permanecer próximas al lugar donde se desarrollaron hasta la etapa adulta (Triplehorn & Johnson, 2005). El número de huevos que una hembra puede poner en cada oviposición puede ser de 50 a 100. El tamaño de los huevos puede ser afectado por distintas razones tales como el tamaño del cuerpo de la hembra, el tamaño de la ingesta de sangre, la edad de la hembra (particularmente en relación con el número previo de oviposición) y variaciones de estación. El total de huevos puestos por una sola hembra durante su vida puede ser de 800 a 1000, número que depende de algunas condiciones, dentro de las cuales se encuentran la longevidad de la hembra, la disposición de comida, el número total de oviposiciones, y la temperatura del ambiente (Goma, 1966).

La forma más común de que *Aedes aegypti* se infecte con el virus del dengue es a través de la picadura de una persona infectada, aunque también puede ocurrir una transmisión vertical del virus, donde los huevos que ovipongan las hembras infectadas se infecten y lleven el virus.

3.3. Control de *Aedes aegypti*

Como control o tratamiento se entiende la destrucción de larvas o adultos por medios mecánicos, químicos o biológicos (Programa Nacional de Vectores, 2001).

Regularmente, las actividades de control llevadas a cabo por el personal del MSPAS en una comunidad, se dividen en control mecánico o saneamiento del medio (eliminación de criaderos o deschatarrización), control químico focal (abatización) y perifocal (nebulizaciones) (Programa Nacional de Vectores, 2001).

3.3.1. Control mecánico

El control mecánico comprende las modificaciones del medio ambiente que impiden y reducen al mínimo la propagación de vectores o el contacto hombre-vector. También ayuda a reducir los criaderos de mosquitos (Parks & Lloyd, 2004). La OMS ha definido tres clases de saneamiento del medio:

- **Modificación del medio:** Transformaciones físicas duraderas del hábitat de los vectores (Servicio apropiado de agua potable).
- **Manipulación del medio:** Cambios temporales en el hábitat del vector. Consisten en el tratamiento (cubriendo o protegiendo) de los recipientes útiles, el almacenamiento adecuado, reciclaje o eliminación de envases (depósitos) inservibles y el tratamiento o eliminación de criaderos naturales.
- **Campaña de eliminación de criaderos o deschatarrización:** Campañas públicas de “deschatarrización” o eliminación colectiva de recipientes desechables de los patios o jardines de las casas (Programa Nacional de Vectores, 2001).

La debilidad de este tipo de tratamiento es que se enfoca en las áreas residenciales y casi no se tratan lugares como los cementerios u otros espacios abiertos, que están fuera de ese perímetro pero siguen teniendo relación y pueden representar una fuente de infestación. Además, un obstáculo importante para la ejecución eficaz de este tipo de control ha sido la dificultad del MSPAS para movilizar y coordinar los recursos necesarios con el fin de lograr y mantener un impacto conductual entre las poblaciones en riesgo de dengue (Parks & Lloyd, 2004).

3.3.2. Control químico

Es el principal método empleado para el control de los vectores. Comúnmente el control químico se utiliza después de realizar el saneamiento del medio. Se aplica tanto en la forma inmadura como en adultos del vector (larvicida y adulticida). La aplicación de larvicidas o el control focal de *Aedes aegypti* generalmente está limitado a los recipientes de uso doméstico que no se pueden destruir, eliminar o tratar de otra forma.

En Guatemala se utiliza desde 1972 el larvicida Temefos (Abate) formulación arenosa al 1% y con dosificación 1 parte por millón (PPM). Esta dosificación es eficaz durante 8 a 12 semanas (Programa Nacional de Vectores, 2001). Este tipo de control resulta efectivo a un corto plazo debido a su poca residualidad. También existe el problema de la difícil aceptación de las personas al Abate en sus recipientes.

En lugares abiertos, como los cementerios, este control se aplica en los contenedores, pero si éstos son cambiados, se pierde completamente el tratamiento, por lo que se debe monitorear constantemente, generando un exceso de trabajo para el personal del Ministerio de Salud.

Los rociamientos manuales o de motor se emplean para aplicar polvo humectable o insecticidas en los recipientes y su vecindad. De este modo se destruyen las infestaciones larvales existentes y subsiguientes, así como los mosquitos adultos que frecuentan estos sitios. Los insecticidas utilizados actualmente son piretroides (Programa Nacional de Vectores, 2001). Dentro de las desventajas de este tipo de control se puede mencionar que esta estrategia debe repetirse constantemente, su costo es elevado, y su eficacia es limitada (Parks & Lloyd, 2004). Además, tiene muy poca residualidad debido a la capacidad del vector de generar resistencia a los insecticidas y a que produce muchos efectos secundarios no deseados, dañinos para el ecosistema y la salud humana.

3.3.3. Control biológico

El principio del control biológico es utilizar organismos que sean enemigos y reguladores naturales de las poblaciones de vectores. El uso de estos agentes tiende a afectar solamente a cierto número de organismos, que se conocen como organismos blanco, a los cuales va dirigido este tipo de control. Generalmente son más aceptados que los mecanismos de control químico, debido a que no generan resultados secundarios no deseados, como daños al ecosistema (Bay *et. al.*, 1973; WHO, 1987).

Las investigaciones sobre el control biológico de vectores persiguen tres objetivos principales: la identificación de nuevos posibles agentes, la evaluación de agentes ya identificados como potenciales controles biológicos y el desarrollo de agentes que han demostrado ser efectivos y seguros (WHO, 1987).

Para el control de *Aedes aegypti* se ha logrado identificar entre los posibles agentes a peces larvívoros, que ya han sido utilizados en varios países de Centroamérica (Vargas, 2003). También se ha evaluado el efecto patogénico de varias especies de nemátodos, como *Romanormis culicivorax*, *Romanormis iyengari* y *Strelkovimermis spiculatus*, encontrando que proporciones 10:1 provocan el 100% de mortalidad de las larvas del vector (Rodríguez *et. al.*, 2005).

Otros agentes son los protozoos microsporidios, los cuales son los parásitos más comunes en causar enfermedades a mosquitos. Cuatro géneros son comunmente encontrados (*Nosema*, *Pleistophora*, *Stempellia* y *Thelohania*). Dentro de los más prometedores para el control hay algunas especies de *Nosema*. También se han investigado hongos que parasitan larvas de *Aedes aegypti*; el género *Coelomomyces* ha demostrado ser especie específico (Bay *et. al.*, 1973).

A principios del siglo antepasado, se realizaron acercamientos con plantas larvicidas para el control de *Aedes aegypti*, lo que condujo a la investigación sobre plantas y

productos vegetales que podrían jugar un papel importante en el control de mosquitos (Bay *et. al.*, 1973). Otros agentes que han sido ampliamente estudiados, son las bacterias esporogénicas, principalmente *Bacillus thuringiensis*. Los resultados han mostrado que se puede alcanzar una mortalidad de hasta el 100% en los primeros días de aplicación y una mortalidad del 70% en 54 días de residualidad (Ponce, 2003).

Algunos invertebrados depredadores son otro tipo de organismos que juegan papeles importantes en la regulación de las poblaciones de varias especies de mosquitos. *Macrocylops albidus*, en particular, ha mostrado preferencia por las larvas de *Aedes aegypti* como alimento (Suárez *et. al.*, 2005). El mosquito del género *Toxorhynchites*, también ha sido identificado como un importante depredador de larvas de mosquitos (Bay *et. al.*, 1973).

A pesar de los avances en el estudio de agentes potenciales, se debe tomar en cuenta que debido a la diversidad de enfermedades vectoriales y los hábitos naturales de los vectores, el control biológico puede representar sólo una parte de un programa de control, que para poder llegar a tener éxito, debe combinarse con métodos químicos, así como tomar en cuenta el manejo ambiental y la participación comunitaria, para formar parte de un programa integrado (Bay *et. al.*, 1973; WHO, 1987).

3.3.3.1. *Toxorhynchites sp*

Clasificación:

Orden	Diptera
Familia	Culicidae
Subfamilia	Toxorhynchitinae
Género	<i>Toxorhynchites</i>
Sub-género	<i>Toxorhynchites</i>

(Reyes, 1990)

El subgénero *Toxorhynchites* consta de 76 especies aproximadamente. Es circumtropical, pues habita la mayoría de regiones tropicales y algunas de América del Norte, Este de Rusia y de Japón (Reyes, 1990).

El ciclo de vida de *Toxorhynchites sp.* no difiere del ciclo de vida de cualquier otra especie de culícido. Consta de huevo, cuatro estadios larvales (L1, L2, L3 y L4), pupa y adulto. Generalmente los huevos son ovalados, de color amarillo o blanco y no son afines al agua, por lo que se mantienen flotando en la superficie de la misma. El período de incubación es de 40 a 60 horas. La viabilidad de los huevos abarca desde un 57% hasta un 100% y se observa un decremento de dicho valor conforme aumenta la edad de la hembra. Los huevos no son resistentes a la desecación en comparación con otras especies, proporcionando una característica del género. La eclosión de los huevos no es sincronizada y ocurre durante el día (Collins & Blackwell, 2000a; Badii *et. al.*, 2006).

La larva de *Toxorhynchites sp.* se compone de tres partes: cabeza, tórax y abdomen. El cuerpo está compuesto en su mayoría de tejido suave y membranoso, pero algunas partes consisten de placas duras y esclerotizadas. Esto permite el nado característico de la larva. La larva tiene aproximadamente 190 pares de setas y varios tipos de espículas. La cabeza se compone de una cápsula esclerotizada, donde se encuentran las partes bucales y antenas anteriores. La forma de la cabeza es cuadrada. Dorso-lateralmente en ambos lados de las partes bucales hay lóbulos formados de un conjunto de espículas robustas y prensiles; también se pueden observar 16 pares de setas. El tórax es un poco más ancho que la cabeza, consiste en 3 segmentos que son el protórax, mesotórax y metatórax, los cuales se distinguen por las setas que en éstos se encuentran (Darsie & Morris, 2000).

El abdomen de la larva consiste en 10 segmentos, los primeros siete son muy similares, los segmentos VIII, IX y X son funcionalmente especializados y morfológicamente diferentes de los otros, el IX segmento no se encuentra diferenciado pero está incorporado en el VIII y X segmento. La larva posee varias placas de soporte tanto en el tórax como en el abdomen, en estas placas se adhieren varias setas y se puede observar

una gran placa lateral en el VIII segmento. Las aberturas espiraculares, para la respiración, están localizadas posteriormente en el VIII segmento abdominal. Estas aberturas están rodeadas por el aparato espiracular, que nace al final de un tubo esclerotizado (sifón) (Darsie & Morris, 2000).

El último estadio acuático es el de pupa, la cual se caracteriza por tener una forma de coma, que se divide en dos regiones. La parte agrandada es conocida como cefalotórax, que consiste en la cabeza y el tórax, y la parte delgada que consiste en el abdomen. Proyectándose desde la parte de atrás del cefalotórax está un par de “trompetas” prominentes conocidas como trompetas respiratorias. El abdomen consiste de nueve segmentos aplastados de movimiento libre. En el dorso del primer segmento se encuentran un par de pelos evidentes, que ayudan a mantener a la pupa en una posición recta en la superficie del agua. Al final del abdomen se encuentra un par de pedales, los cuales le ayudan a nadar (figura 3) (Goma, 1966). El estadio de pupa puede durar de 7 a 8 días. Este estadio, a pesar de ser móvil, no se alimenta ya que es la etapa crítica donde ocurren todos los cambios morfológicos y fisiológicos para que pase a la fase adulta de vuelo (Badii *et. al.*, 2006).

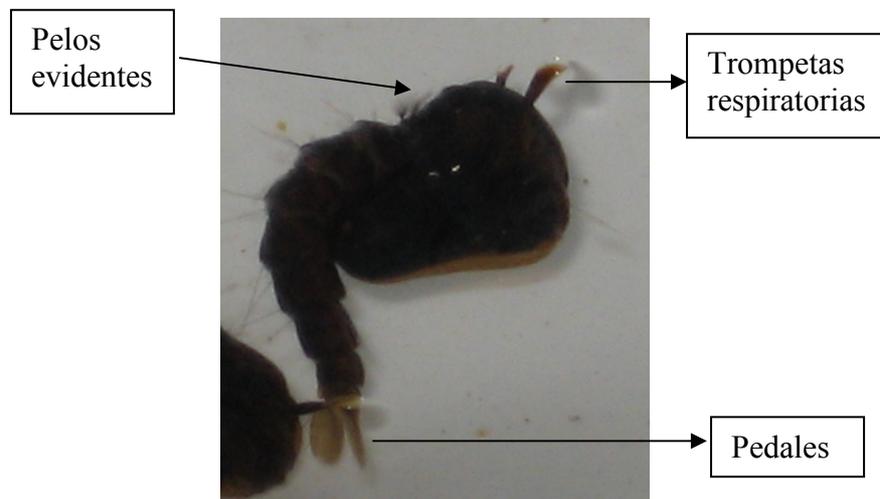


Figura 3: Pupa de *Toxorhynchites* donde se observan distintas estructuras.

El cuerpo de los adultos está compuesto de placas endurecidas, llamadas escleritos, separados entre sí por líneas conocidas como suturas o por membranas de varios tipos. Estas estructuras comprenden el integumento o cobertura externa del cuerpo. Las hembras, principalmente, presentan una gran variedad de escamas, éstas pueden ser planas, angostas o curvas. El color puede variar y pueden ser negras, cafés, doradas, amarillas, blancas, azules o plateadas. El cuerpo de los adultos está dividido en 3 principales regiones: la cabeza, el tórax y el abdomen. La cabeza es de forma ovoide y una gran parte está ocupada por los ojos compuestos. En la cabeza se encuentran los siguientes apéndices: 2 antenas, 2 palpos y la probóscide cuya forma es fuertemente curvada hacia abajo, una característica taxonómica importante (Darsie & Morris, 2000).

El tórax se divide en protórax, mesotórax y metatórax, cada uno contiene un par de patas, el mesotórax tiene un par de alas funcionales y el metatórax un par de alas modificadas conocidas como halterios. El mesotórax es típicamente agrandado para acomodar los músculos del vuelo asociados a las alas, el protórax y metatórax son más pequeños. Cada ala está compuesta de venas gruesas longitudinales, entre las venas se encuentran celdas membranosas y transparentes. Las patas se forman de 5 partes principales coxa, trocánter, fémur, tibia y tarsos. El tarso se compone de segmentos conocidos como tarsómeros (Darsie & Morris, 2000).

El abdomen está compuesto por 10 segmentos de los cuales los primeros 7 son bastante similares en su estructura externa. Los 3 últimos segmentos están especializados para la oviposición y excreción. Cada uno de los 7 primeros segmentos tiene un esclerito dorsal, el tergum, y un esclerito ventral, el sternum. En los últimos segmentos se forma la genitalia externa comúnmente conocida como terminalia. Las estructuras más prominentes de la terminalia en los machos son los claspers, utilizados como estructuras de sujeción durante la cópula. La genitalia externa de las hembras es inconspicua, consistiendo sólo en un par de estructuras delgadas llamadas cerci (Goma, 1966; Darsie & Morris, 2000).

Las hembras y machos de *Toxorhynchites sp.* se alimentan únicamente de néctar y otras fuentes de azúcar. Las hembras son capaces de encontrar rápidamente los contenedores con presencia de larvas de mosquitos (principalmente de *Aedes aegypti*, debido a que las dos especies se desarrollan en condiciones similares) y oviponer en ellos. Rara vez se posan en la superficie del agua para oviponer, en vez de esto realizan un “vuelo de oviposición” que consiste de 6 a 43 vueltas elípticas, en donde los huevos son soltados en la última vuelta. Cada hembra puede llegar a poner entre 80 y 100 huevos, los que distribuye en diferentes estanques (Bay *et. al.*, 1973; Reyes, 1990; Collins & Blackwell, 2000a).

Las hembras oviponen en la estación lluviosa. Sobreviven a la estación seca como larvas de cuarto estadio, completan su desarrollo juvenil y emergen en el principio de la época lluviosa. El ritmo de oviposición varía y aún no están muy claras estas variaciones, se cree que se debe a la humedad y a los patrones de lluvia (Bay *et. al.*, 1973; Collins & Blackwell, 2000a).

Potencial de *Toxorhynchites sp.* como agente de control biológico. Las larvas de *Toxorhynchites sp.* presentan un comportamiento particular. Se alimentan de otras larvas de mosquitos del mismo tamaño e incluso del doble de su tamaño, además de otros artrópodos, llegando inclusive a alimentarse de detritus. El número de larvas que pueden llegar a ser consumidas por una sola larva de *Toxorhynchites sp.*, depende de varios factores como el tamaño del contenedor donde se encuentren, el tipo y tamaño de las presas, la temperatura del agua y el nivel de luminosidad.

Durante su desarrollo, una larva de *Toxorhynchites sp.* puede llegar a consumir hasta 500 larvas de primer estadio y 300 larvas de cuarto estadio. Aproximadamente dos días antes de pupar, las larvas se comportan de manera asesina matando, sin consumir, todos los otros habitantes del mismo contenedor. El estadio larval puede durar de 10 a 16 días, dependiendo de la especie y las condiciones ambientales en las que se presenten (Bay *et. al.*, 1973; Collins & Blackwell, 2000a; Badii *et. al.*, 2006).

El comportamiento depredador de las larvas hace que puedan funcionar como agentes de control de mosquitos vectores de enfermedades que se encuentren en el mismo contenedor. Entre algunos se puede mencionar *Aedes aegypti*, *Aedes simpsoni* y *Aedes albopictus*, los cuales se desarrollan en pequeños contenedores que son difíciles de controlar debido a lo pequeño del hábitat, a la dispersión de dicho hábitat y su inaccesibilidad (Bay *et. al.*, 1973; Reyes, 1990).

Si se cuenta con los materiales necesarios, *Toxorhynchites sp.* puede ser cultivado en grandes cantidades y ser liberado en puntos estratégicos (Bay *et. al.*, 1973; Reyes, 1990). El uso de las larvas representa una alternativa potencial para disminuir el uso de pesticidas, que generan grandes daños a la salud y al ecosistema (Collins & Blackwell, 2000a).

3.4. Estudios previos

El control biológico es una línea de investigación que ha tenido mucho auge desde los últimos años del siglo antepasado. El control biológico de mosquitos, en particular, ha sido objeto de varios estudios, debido a la importancia en controlar este tipo de vectores.

Bay *et. al.*, (1973), elaboraron el libro “Control de mosquitos con perspectivas para países en desarrollo”, donde se enfoca el uso de invertebrados depredadores, entre ellos *Toxorhynchites*, como un efectivo control biológico, enfatizando en su facilidad de cultivo, transporte y aplicación en estadio adulto.

Otras investigaciones se han centrado en la sistemática de *Toxorhynchites* y su potencial como control biológico, identificando aspectos importantes de su biología, entre los que se pueden mencionar la morfología de los huevos de *Toxorhynchites moctezuma* y el comportamiento de oviposición de *Toxorhynchites moctezuma* y *Toxorhynchites amboinensis*, tanto en condiciones de campo como de laboratorio; además de obtener importantes datos de taxonomía. A partir de estos estudios, se generaron conocimientos de

interés para futuros intentos de aplicación del agente en los programas de control de diferentes vectores, haciendo mención de las ventajas y desventajas de su uso, y la efectividad de éste en un manejo integrado con otros tipos de control biológico (Steffan, 1975; Chadee, Small & O'Malley, 1987; Collins & Blackwell, 2000a; Collins & Blackwell, 2000b).

Diferentes estudios presentan las experiencias obtenidas durante la aplicación de *Toxorhynchites*, en programas de control que involucran la crianza masiva de varias especies de este género para la liberación en el campo y la importancia que tiene este tipo de control en la vigilancia de *Aedes aegypti*. Con respecto a *Toxorhynchites rutilus* se han proporcionado datos con referencia al control biológico de mosquitos habitantes en recipientes, donde muestran lo positivo y lo negativo de este tipo de control (Gerberg, 1985; Nelson, 1986; Lounibos & Campos, 2002; Badii *et. al.*, 2006). Aditya *et. al.*, (2006) realizan una importante investigación donde comparan la actividad depredadora de la especie de escarabajo *Rhantus sikkimensis* y la larva de *Toxorhynchites splendens* en larvas de mosquitos vectores en Darjeeling, India; concluyendo que las dos especies regulan efectivamente las poblaciones de mosquitos.

En Guatemala, se han desarrollado investigaciones que se centran en la distribución y relación geográfica de varias especies de la familia Culicidae. Se ha realizado la descripción de varias especies del género *Toxorhynchites* indicando que su distribución es, principalmente, en el suroccidente del país (Clark & Darsie, 1983; Ibáñez & Gómez, 1995; Salvatella, 1996; Tabaru *et. al.*, 1998; Diéguez *et. al.*, 2006).

4. JUSTIFICACIÓN

El dengue es una enfermedad recurrente y endémica en los países de Centroamérica. Afecta directamente a la salud humana, e indirectamente puede generar pérdidas debido a la reducción de la producción, manteniendo a la sociedad en pobreza económica (OPS, 1998). Según reportes del boletín epidemiológico del MSPAS, para los primeros cinco meses del año 2007, ya se habían reportado 977 casos de dengue clásico y dos de dengue hemorrágico en el país, mostrando un aumento en el número de casos con respecto al mismo período del año anterior (Centro Nacional de Epidemiología, 2007).

El vector *Aedes aegypti* es un mosquito principalmente doméstico aunque existen formas silvestres. Sus sitios de cría pueden ser cualquier depósito, natural o artificial, que contenga agua limpia. En condiciones ideales, las poblaciones del vector se combaten con medidas de saneamiento del medio y con un abastecimiento de agua por tubería que elimine gran parte de los hábitats de la especie creados por el hombre (OPS, 1982). Sin embargo, a nivel nacional, el abastecimiento de agua es inconstante, a la vez que existen muchos asentamientos y sitios baldíos que carecen de sistemas de drenaje adecuados, lo cual complica el panorama ya que hace necesario el almacenamiento de agua en depósitos que se constituyen en potenciales criaderos para el vector (Birley, 1992). Las estrategias de control vectorial empleadas principalmente por el MSPAS incluyen tratamientos mecánicos y químicos que han sido bien estudiados, pero han probado ser no viables en futuros cercanos debido a problemas técnicos, a la resistencia a los insecticidas químicos, a los efectos secundarios nocivos para el ecosistema y la salud humana y a las limitaciones a las cuales se ha enfrentado el país a través de su historia (Bay *et. al.*, 1973; Castillo, 2000). Esta situación hace necesario que los programas de control del mosquito incluyan medidas integrales que abarquen otro tipo de métodos como el control biológico.

Los métodos de control biológico para el vector han sido poco estudiados y poco utilizados en el país. En otros países, se han identificado como posibles agentes a peces larvívoros, nemátodos, protozoos, hongos, bacterias, hormonas reguladoras del crecimiento,

plantas larvicidas, invertebrados depredadores, etc (Bay *et. al.* 1973); muchos de los cuales podrían ser estudiados en Guatemala, para probar su viabilidad y poder ser integrados a los operativos de vigilancia y control entomológico de *Aedes aegypti*. Entre los agentes con mayor potencial se han identificado a las larvas del mosquito *Toxorhynchites sp.* (Aditya *et. al.*, 2006). Su comportamiento larvario depredador y el hecho de que en la fase adulta, tanto machos como hembras, se alimentan únicamente de néctar, aunado a la capacidad de las hembras para detectar contenedores con *Aedes aegypti*, hacen que este organismo sea un importante agente de control para las fases larvarias de *Aedes aegypti* (Collins & Blackwell, 2000a), además de que se encuentra distribuido en varias zonas del país.

En Guatemala, espacios abiertos como cementerios o terrenos baldíos, representan un problema para el control, debido a que poseen gran cantidad de contenedores (floreros) sin supervisión, que pueden convertirse en criaderos potenciales del vector del dengue con las lluvias. En el caso de los cementerios, se pueden encontrar diversidad de floreros con agua, lo cual representa un grave riesgo ya que estos lugares tradicionalmente se encuentran en el centro o lugares aledaños a poblaciones urbanas (Vezzani, 2007), lo que los convierte en un problema potencial para el personal de salud, ya que además de la gran cantidad de viviendas deben mantener constante vigilancia en estos sitios. El MSPAS aplica control químico en estos lugares, sin embargo, resulta en una pérdida económica ya que generalmente no da resultados efectivos, encontrando siempre contenedores positivos con larvas de *Aedes aegypti*. Sumándole a esta razón la poca disponibilidad de personal que posee el MSPAS, los cementerios representan un grave riesgo para la proliferación del vector.

Debido a las características de *Toxorhynchites*, este podría ser un agente útil para el control del vector en estas áreas, ya que dentro de sus ventajas se encuentra la capacidad de las hembras de localizar contenedores con larvas de *Aedes aegypti* y oviponer en ellos, así como su fácil manejo y liberación; características que reducirían la cantidad de tiempo que el personal de salud tendría que utilizar en ellos, así como el riesgo de que se formen focos de alta productividad del vector.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Determinar la eficacia de larvas depredadoras de *Toxorhynchites sp.* en los cementerios municipales de Villa Nueva y Amatitlán, para el control biológico de larvas de *Aedes aegypti*, vector de la enfermedad del dengue.

5.2. Específicos

5.2.1. Montar y mantener una colonia de *Toxorhynchites sp.* para su uso como agentes potenciales de control biológico, en el Bioterio del Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología –LENAP-.

5.2.2. Verificar en condiciones de laboratorio el potencial de las larvas depredadoras de *Toxorhynchites sp.* sobre las fases larvales de *Aedes aegypti*, vector del dengue.

5.2.3. Determinar los indicadores entomológicos de *Aedes aegypti* antes y después del uso del mosquito *Toxorhynchites sp.* como control biológico, en los cementerios municipales de Villa Nueva y Amatitlán.

6. HIPÓTESIS

Las larvas depredadoras del mosquito *Toxorhynchites sp.* son agentes efectivos de control biológico de las larvas de *Aedes aegypti* en condiciones de campo.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Universo

7.1.1. Población

Larvas de *Aedes aegypti* presentes en el cementerio municipal de Villa Nueva y el cementerio municipal de Amatitlán.

7.1.2. Muestra

Criaderos de larvas de *Aedes aegypti*, escogidos al azar, presentes en el cementerio municipal de Villa Nueva y en el cementerio municipal de Amatitlán.

7.2. Métodos

La investigación constó de una fase de laboratorio y una de campo.

7.2.1. Colecta de larvas y pupas de *Toxorhynchites sp.*

Con la asesoría del personal de vectores del MSPAS se seleccionó el lugar de colecta de los especímenes. La búsqueda se realizó en llanteras ubicadas en el municipio de Barberena, Santa Rosa, Guatemala (anexo 1). Se revisaron las llantas que se encontraban en lugares sombreados, presentaban agua relativamente limpia y presencia de larvas de *Aedes aegypti*, características necesarias para la presencia de *Toxorhynchites*.

Para la colecta se utilizaron larveros para mosquitos. Las larvas y pupas capturadas se colocaron en cajas plásticas con agua del mismo contenedor del que se extrajeron. Los especímenes se trasladaron al Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología – LENAP-.

7.2.2. Mantenimiento de colonia de *Toxorhynchites sp.* en condiciones de laboratorio

Los especímenes vivos llevados al LENAP, fueron separados de acuerdo a su estadio larval (L-1, L-2, L-3, L-4) y se colocaron en bandejas de plástico con agua limpia, a temperatura ambiente y en un lugar con poca intensidad de luz. Las larvas fueron alimentadas con larvas de *Aedes aegypti* del mismo estadio, colocándose en las bandejas de 25 a 35 por cada larva de *Toxorhynchites sp.*, cada 24 a 48 horas. Para mantener una buena producción de la colonia, en épocas de frío, se mantuvieron condiciones controladas de calor y humedad.

Las bandejas con pupas fueron colocadas dentro de un insectario especial para mosquitos, en espera de la emergencia de los adultos. Tanto las hembras como los machos se mantuvieron en el mismo recinto y se alimentaron con una solución de miel comercial y agua, que era cambiada cada semana. Para que las hembras ovipusieran se colocaron dentro del insectario varios recipientes de color negro con agua y larvas de *Aedes aegypti* (anexo 2). Una vez obtenidos los huevos y L-1 los recipientes fueron extraídos del insectario y tanto huevos como larvas se trasladaron a nuevas bandejas, repitiendo el procedimiento, hasta que llegaran a la fase adulta. De esta manera se obtuvo una producción controlada de *Toxorhynchites sp.*

7.2.3. Mantenimiento de una colonia de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio

Las larvas y pupas de *Aedes aegypti* se obtuvieron por medio de donaciones de la sección de entomología del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. A partir de dichos especímenes se montó una colonia, que permitió cubrir la cantidad necesaria de larvas para el estudio.

Los especímenes se mantuvieron en el bioterio del LENAP, brindándoles condiciones adecuadas para su desarrollo. Las larvas se separaron de acuerdo a su estadio (L-1, L-2, L-3, L-4) y se colocaron en bandejas de plástico con agua limpia a temperatura ambiente y en un lugar con poca intensidad de luz. Se alimentaron con polvo de Incaparina comercial. Al obtener pupas, éstas se transfirieron a un insectario, donde se esperó la emergencia de los adultos. En las dos últimas fases se tuvo especial cuidado, para evitar que los adultos escaparan. Adicionalmente, las bandejas de plástico con larvas se mantuvieron tapadas con mallas finas de tul y en la boca de los insectarios se colocaron mangas de manta.

Los machos y las hembras se mantuvieron en el mismo insectario, con el fin de mantener una producción de larvas de *Aedes aegypti*. Los machos se alimentaron con una solución de miel comercial con agua, la cual se cambió semanalmente. Las hembras (hematófagas) fueron alimentadas con sangre fresca de ratón. Dentro del insectario se colocaron bandejas con agua con tiras de papel mayordomo en la pared interior, para que se adhirieran a éstas los huevecillos ovipuestos por las hembras. Las tiras se extrajeron y se colocaron en bandejas con agua, para que eclosionaran los huevecillos y obtener nuevas larvas, repitiéndose el procedimiento cada vez que fue necesario.

7.2.4. Descripción del ciclo de vida de *Toxorhynchites sp.* en condiciones de laboratorio

En la colonia de laboratorio, se realizaron observaciones sobre el comportamiento y ciclo de vida de los especímenes de *Toxorhynchites*. En cada oviposición obtenida en condiciones de laboratorio, se tomaron datos de la fase acuática y fase aérea. Se midió el porcentaje de mortalidad y sobrevivencia de las larvas por estadio y de las pupas; así como también se cuantificó el tiempo en días, que duró cada ciclo.

Para la toma de datos se revisó diariamente la colonia anotando en tarjetas especiales, el tiempo que duró, en días, el cambio de cada estadio. De la información contenida en las tarjetas, se anotó en hojas aparte, de cada oviposición, el número de oviposición, la

cantidad de huevos obtenidos, los huevos que fueron viables y los que no fueron viables, la cantidad de larvas que cambiaron de estadio hasta llegar a pupa y adulto. Luego de la emergencia de los adultos se midió el porcentaje de hembras y machos (anexo 3). El porcentaje de sobrevivencia y mortalidad se midió a partir de los datos registrados sobre cuantas larvas o pupas alcanzaban el siguiente estadio.

Los especímenes muertos en la colonia de laboratorio fueron utilizados para elaborar una colección de referencia, con especímenes adultos, larvas y pupas. Utilizando la clave de identificación “The Mosquitoes of Guatemala” de Clark & Darsie (1983), se identificó a *Toxorhynchites grandiosus* como la especie colectada para el estudio (anexo 4).

7.2.5. Pruebas de laboratorio

Para determinar la eficacia de *Toxorhynchites grandiosus* como agente de control biológico en condiciones de laboratorio se realizaron dos experimentos. El primero consistió en colocar una larva de L1 en un beaker de 500 ml y agregar en el mismo 25 larvas del mismo estadio de *Aedes aegypti*. Se esperaron 24 horas y al cabo de este tiempo, se anotó el número de presas muertas o ingeridas y se restableció el número de presas original. Este procedimiento se repitió durante tres días. El mismo experimento se realizó para cada uno de los estadios larvales restantes (L2, L3, L4) y en cada caso se contó con 5 réplicas y un control (presas sin depredadores).

En el segundo experimento, se colocaron tres larvas de L1 en una bandeja con medidas de 8’’X 5’’X 3’’ y una capacidad de 1.5 litros de agua y se agregaron 50 larvas del mismo estadio de *Aedes aegypti*. Luego de 24 horas se anotó el número de presas muertas, ingeridas o faltantes y se restableció el número original de presas. El experimento se llevó a cabo durante tres días repitiéndose el mismo procedimiento. El mismo experimento se realizó para cada uno de los estadios larvales restantes (L2, L3, L4) y en cada caso se contó con 5 réplicas y un control (presas sin depredadores). Para ambos experimentos se promediaron las réplicas para el cálculo de los índices y de los análisis estadísticos.

7.2.5.1. Cálculo del impacto de depredación (PI)

Para realizar el cálculo del PI, se utilizaron los datos de depredación obtenidos para cada estadio larval en el primer experimento. Estos fueron sometidos a la siguiente ecuación:

$$PI = \sum PE_n / T$$

Donde: PI = es el impacto de depredación;

PE = es la sumatoria del número de presas ingeridas o muertas;

T = es el tiempo en días (Aditya *et. al.*, 2006).

7.2.5.2. Cálculo del rango de aclaración (CR)

El CR refleja el efecto combinado de la habilidad de buscar, matar y consumir del depredador y la evasión de la presa, en la unidad de tiempo y espacio (Aditya *et. al.*, 2006). Para calcularlo se utilizaron los datos obtenidos del número de presas muertas para cada estadio en el segundo experimento. Los datos fueron sometidos a la siguiente ecuación:

$$CR = V(\ln PE) / TN$$

Donde: CR = es el rango de aclaración;

V = volumen de agua en litros;

PE = la sumatoria del número de presas ingeridas o muertas;

T = tiempo en días;

N = número de depredadores (Aditya *et. al.*, 2006).

Adicionalmente, los datos obtenidos del número de presas muertas fueron sujetos a un ANDEVA (análisis de varianza) de una vía, para establecer si existía o no una diferencia significativa de depredación entre días, entre estadios y entre experimentos.

7.2.6. Fase de campo

7.2.6.1. Evaluación de la situación entomológica de *Aedes aegypti* en los sitios de estudio

Se determinó el grado de infestación de larvas de *Aedes aegypti* en los cementerios municipales de Villa Nueva y Amatitlán. Con ayuda del personal de salud del MSPAS, se elaboró un croquis de cada sitio. En cada cementerio se sectorizó el área de estudio en dos, escogiéndose, para trabajar, el sector donde los nichos presentaban recipientes o contenedores con las condiciones adecuadas para la presencia de *Aedes aegypti*. En el otro sector no se encontraron este tipo de recipientes debido a que no está permitido su uso.

Debido al recurso humano disponible, en el sector seleccionado, se realizó una búsqueda para detectar una infestación mayor del 5%, quedando una probabilidad del 5% de no encontrar ningún nicho positivo (Programa Nacional de Vectores, 2001). Con base en el manual de procedimientos del Programa Nacional de Vectores (2001), se obtuvo, por medio de valores estándar, el número de unidades que debían ser inspeccionadas, denominando como nicho (tumba o panteón) a cada unidad (anexo 5).

El sector del cementerio de Villa Nueva, contaba con 400 nichos, por lo que se inspeccionaron 55 de éstos. El sector del cementerio de Amatitlán, contaba con 500 nichos, por lo que se revisaron 56. Para saber qué nichos debían revisarse se dividió el número total de éstos dentro del número a inspeccionar (anexo 5). El número resultante indicó cada cuantos nichos se debía realizar la inspección. Posteriormente se numeraron llevando un orden de izquierda a derecha. Cuando no se pudo inspeccionar el nicho, se inspeccionó el nicho contiguo al lado izquierdo (sin alteración del recuento).

En el cementerio de Villa Nueva los lugares que se revisaron se espaciaron cada 7 nichos y en el cementerio de Amatitlán cada 8. En cada nicho inspeccionado se localizaron todos los contenedores (o floreros) que tuvieran las condiciones adecuadas para la presencia

del vector. Se anotó el número y si estaban positivos o negativos para la presencia de larvas de *Aedes aegypti*. Los datos se registraron en el formulario A-1 del Ministerio de Salud (Programa Nacional de Vectores, 2001) (anexo 6).

Posteriormente se calcularon los indicadores entomológicos o índices aédicos, los cuales se utilizaron para evaluar la situación entomológica de los sitios de estudio antes y después del uso de *Toxorhynchites grandiosus*. Los índices utilizados se describen a continuación.

Índice de nicho (IC) o índice de infestación: porcentaje de nichos infestados con larvas, pupas o ambas de *Aedes aegypti*.

$$\text{IC} = \frac{\text{Número de nichos infestados}}{\text{Número de nichos inspeccionados}} \times 100$$

Índice de recipiente (IR): porcentaje de recipientes con agua infestados con larvas, pupas o ambas de *Aedes aegypti*.

$$\text{IR} = \frac{\text{Número de recipientes positivos}}{\text{Número de recipientes con agua inspeccionados}} \times 100$$

Índice de Breteau (IB): número de recipientes positivos con larvas, pupas o ambas de *Aedes aegypti*, por el número de nichos inspeccionados.

$$\text{IB} = \frac{\text{Número de recipientes positivo}}{\text{Número de nichos inspeccionados}} \times 100$$

El IC o índice de infestación considera la distribución del vector en la localidad; el IR la proporción de recipientes positivos con agua más su productividad y el IB establece la relación entre los depósitos positivos y las casas. Cuando el valor obtenido del IC es similar al IB, se puede decir que el problema está generalizado. Si el IB es mayor que el IC, esto puede indicar que el problema está focalizado, es decir, que existe un foco de intensa reproducción en una pequeña sección de la localidad (Programa Nacional de Vectores, 2001).

Luego de un mes de haber finalizado las pruebas de control biológico en campo, se regresó a los cementerios para hacer una nueva evaluación entomológica y se determinó si hubo cambio o no, en el grado de infestación. El tiempo entre una evaluación y la otra se estimó de manera que fuera suficiente para que se pudiera desarrollar el ciclo biológico de *Toxorhynchites grandiosus*. Las dos evaluaciones entomológicas fueron completamente independientes una de la otra.

7.2.6.2. Pruebas de control biológico

Para determinar la efectividad de *Toxorhynchites grandiosus* como agente de control biológico en condiciones de campo, se realizaron dos pruebas, aplicándose una en cada cementerio.

Cementerio de Villa Nueva: En los recipientes o contenedores en los que se encontró *Aedes aegypti* en la evaluación entomológica inicial, se realizó un conteo de larvas y/o pupas presentes y se anotó el dato en una boleta de registro. Con base en la cantidad encontrada, se introdujo una cantidad determinada de larvas de *Toxorhynchites grandiosus*, la cual se calculó de acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas de laboratorio. Durante 3 días, se revisaron los recipientes cada 24 horas, para hacer un conteo de larvas de *Aedes aegypti*. Los datos obtenidos del número de presas muertas fueron sujetos a una ANDEVA (análisis de varianza) de una vía, para establecer si existió o no una diferencia significativa en depredación entre días.

Cementerio de Amatitlán: Con base en el índice de infestación (proyección de número de nichos positivos en el cementerio) detectado en la evaluación inicial, se esperaba que hubiera aproximadamente 20 nichos positivos, por lo que se realizó una liberación de adultos de *Toxorhynchites grandiosus* en el centro del cementerio.

8. RESULTADOS

8.1. Ciclo de vida de *Toxorhynchites grandiosus* en condiciones de laboratorio

Durante el desarrollo de la investigación se registraron las observaciones realizadas en 12 diferentes oviposiciones, en las cuales se obtuvo un total de 172 huevecillos, de los que únicamente el 39.73% alcanzó la fase adulta (Tabla 1). Las oviposiciones no eran realizadas en un solo vuelo, sino que se distribuyeron en varias ocasiones durante un período de uno a tres días. La viabilidad de los huevecillos fue de un 72.09% (anexo 7); en los estadíos siguientes el porcentaje de especímenes vivos fue de un 83 a un 98% (Tabla 2). El promedio de duración del ciclo de vida fue de aproximadamente 48 días (Tabla 3).

Tabla 1: Cantidad de huevos, larvas, pupas y adultos por oviposición y porcentaje de mortalidad y viabilidad.

Oviposición	Fecha	Huevecillos	L1	L2	L3	L4	Pupa	Adulto	mortalidad	% vida
1	19/8	26	18	17	15	13	10	10	61.54%	38.46%
2	22/8	12	12	12	9	9	9	9	25%	75%
3	27/8	19	8	5	5	2	2	2	89.48%	10.52%
4	29/8	15	9	8	8	7	4	4	73.33%	26.67%
5	16/9	15	9	7	7	7	7	7	53.33%	46.67%
6	20/9	6	3	2	2	2	2	2	66.67%	33.33%
7	22/9	6	6	6	6	6	6	6	0	100%
8	03/10	3	3	1	1	1	1	1	66.67%	33.33%
9	8/10	38	31	30	22	19	14	14	63.16%	36.84%
10	15/11	19	17	13	12	10	10	9	52.64%	47.36%
11	23/11	7	3	3	2	2	2	2	71.43%	28.57%
12	20/11	6	5	3	0	0	0	0	100%	0%
	tot	172	124	107	89	78	67	66	60.27%	39.73%

L1, L2, L3 y L4 = estadíos larvales; %vida = porcentaje de vida de huevo hasta adulto.

Tabla 2: Porcentajes de las larvas vivas y muertas de *Toxorhynchites grandiosus* por estadio.

Estadio	Especímenes muertos	Especímenes vivos
L1	13.70%	86.3%
L2	16.82%	83.18%
L3	12.35%	87.65%
L4	14.10%	85.9%
Pupa	1.49%	98.51%

Tabla 3: Duración en días de cada estadio de *Toxorhynchites grandiosus*.

Oviposición	Eclosión Huevecillos	L1	L2	L3	L4	Pupa	Adulto
1	2	3	3	4	12	9	17
2	1	4	3	5	8	7	18
3	1	3	3	4	12	8	17
4	1	4	3	4	11	8	18
5	2	4	8	5	6	8	18
6	2	3	4	5	4	8	18
7	2	2	4	4	5	8	18
8	2	6	4	2	5	8	18
9	2	4	5	6	8	8	18
10	2	5	6	5	7	8	18
11	1	5	5	6	8	8	18
12	1	4	5	6	7	8	18
Prom	1.58	3.91	4.41	4.66	7.75	8	17.83

L1, L2, L3 y L4 = estadios larvales; Prom = promedio en días.

La cópula y oviposición de los adultos ocurrió en un periodo de 15 a 30 días. El porcentaje de emergencia fue de 45 a 50% machos y 50 a 55% hembras.

Se observaron diferentes comportamientos descritos para otras especies del género, entre los que se incluye el asesino pre-pupa, canibalismo, preferencia por contenedores de color negro para la oviposición, capacidad de devorar larvas del doble de su tamaño, vuelo de oviposición y depredador de pupas de *Aedes aegypti*.

8.2. Pruebas de control biológico en condiciones de laboratorio

Los resultados de los ANDEVAS mostraron que, para ambos experimentos, el número de presas consumidas no varió significativamente, entre los días que duró el

experimento (Tabla 4 y 5). En el primer experimento se observó que en promedio, cada L1 de *Toxorhynchites grandiosus* consumió de 4 a 7 L1 de *Aedes aegypti* por día; un L2 consumió de 4 a 6; un L3 de 6 a 12 y un L4 de 13 a 16.

En el segundo experimento se observó que en promedio 3 L1 de *Toxorhynchites grandiosus* consumieron de 4 a 6 L1 de *Aedes aegypti* por día; 3 L2 consumieron de 7 a 11 larvas; 3 L3 consumieron de 6 a 9 y 3 L4 consumieron de 18 a 30 larvas.

Tabla 4: Valores estadísticos de los ANDEVAS realizados en el primer experimento.

Estadio	Valor de F	Valor de P
L1	0.807	P>0.05
L2	0.429	P>0.05
L3	1.803	P>0.05
L4	0.189	P>0.05

Tabla 5: Valores estadísticos de los ANDEVAS realizados en el segundo experimento.

Estadio	Valor de F	Valor de P
L1	0.153	P>0.05
L2	0.356	P>0.05
L3	0.272	P>0.05
L4	0.980	P>0.05

A partir de los ANDEVAS de una vía, utilizando los promedios de las presas muertas o ingeridas para cada estadio en cada experimento por separado, se encontró que no existe diferencia significativa en la cantidad de presas muertas o consumidas, entre los estadios de las larvas de *Toxorhynchites grandiosus*. Los resultados se muestran en la tabla 6. El ANDEVA para comparar la cantidad de presas muertas o consumidas entre experimentos, tuvo un valor de $P=0.055 > 0.05$, mostrando que no existen diferencias significativas entre éstos.

Tabla 6: Valores estadísticos de los ANDEVAS de los experimentos 1 y 2 por el tiempo que duró cada experimento (tres días), entre los cuatro estadios de las larvas de *Toxorhynchites grandiosus*.

Experimentos	Valor de F	Valor de P
Experimento 1	0.063	P>0.05
Experimento 2	0.114	P>0.05

8.2.1. Impacto de depredación (PI) y rango de aclaración (CR)

El PI, calculado a partir del primer experimento, fue de 32.33 para las L1; de 28 para las L2; de 51.67 para las L3 y de 85 para las L4. Los valores obtenidos en el ANDEVA para los datos de PI mostraron que no hubo diferencia significativa entre los cuatro estadios larvales. Los resultados muestran que, en general, a medida que avanza el estadio larval es mayor el valor del PI.

El CR, calculado en el segundo experimento, fue de 0.76 para las L1, 0.85 para las L2; 0.82 para las L3 y 0.99 para las L4. A pesar que el CR no varió significativamente entre los cuatro estadios, sí se pudo observar un aumento en el índice a medida que avanzaba el estadio larval.

8.3. Fase de campo

8.3.1. Primera Evaluación Entomológica

Durante el mes de noviembre del año 2007 se realizó la primera evaluación de la situación entomológica de *Aedes aegypti* en los cementerios municipales de Villa Nueva y Amatitlán (anexo 8 y 9).

En el cementerio de Villa Nueva se revisaron 55 nichos y 283 contenedores, de los cuales 3 nichos y 6 contenedores fueron positivos. En el cementerio de Amatitlán se revisaron 56 nichos y 320 contenedores, de los cuales 2 nichos y 5 contenedores fueron

positivos. Los índices entomológicos calculados para cada cementerio se presentan en las tablas 7 y 8.

Tabla 7: Índices aélicos del cementerio municipal de Villa Nueva. Noviembre del 2007.

Indicador entomológico	Resultado
Índice nicho (IC)	5.45 %
Índice recipiente (IR)	2.12 %
Índice Breteau (IB)	10.90 %

Tabla 8: Índices aélicos del cementerio municipal de Amatitlán. Noviembre del 2007.

Indicador entomológico	Resultado
Índice nicho (IC)	3.57 %
Índice recipiente (IR)	1.56 %
Índice Breteau (IB)	8.93%

En ninguno de los contenedores positivos de ambos cementerios, se encontraron larvas de *Toxorhynchites grandiosus* (anexo 10).

8.3.2. Pruebas de control biológico

8.3.2.1. Cementerio de Villa Nueva

En el nicho positivo 1 se encontraron alrededor de 90 larvas de *Aedes aegypti*; en el 2 alrededor de 200 y en el 3 alrededor de 75. Con base en estos números, en el nicho positivo 1 se introdujo una L4 de *Toxorhynchites grandiosus*. En el nicho positivo 2, se introdujeron dos larvas (una L4 y una L2). En el nicho positivo 3, se introdujeron dos L4. Debido a que en condiciones de campo varió el número de depredadores y no se tuvo control sobre todas las condiciones ambientales, no se pudieron calcular los índices de PI y

CR; por lo que sólo se calculó un promedio del número de presas muertas o consumidas por las larvas de *Toxorhynchites grandiosus* introducidas en cada nicho.

En el nicho positivo 1, la larva de *Toxorhynchites grandiosus* consumió un promedio de 26.67 larvas de *Aedes aegypti* por día; en el 2, consumieron un promedio de 58.33 larvas por día y en el 3, un promedio de 21.67 larvas por día. El ANDEVA de una vía aplicado a los datos, mostró que no hubo diferencia significativa en la cantidad de presas muertas o ingeridas en los días que duró el experimento, entre los nichos positivos ($P = 0.828 > 0.05$).

8.3.2.2. Cementerio de Amatitlán

La prueba de control biológico se realizó liberando 20 adultos de *Toxorhynchites grandiosus*, 15 hembras y 5 machos (anexo 11). Debido a la disponibilidad de adultos en la colonia de laboratorio se liberaron 15 hembras, bajo el supuesto de que una hembra puede oviponer en más de un recipiente. Adicionalmente se liberaron cinco machos esperando que hubiera cópula y reproducción en el sitio.

8.3.3. Segunda Evaluación Entomológica

En el mes de diciembre de 2007, se llevó a cabo la segunda evaluación de la situación entomológica de *Aedes aegypti* en ambos cementerios (anexo 12 y 13).

El número de nichos revisados en cada cementerio fue el mismo que en la primera evaluación, mientras que el número de recipientes varió. En el cementerio de Villa Nueva se revisaron 331 contenedores; 3 nichos y 4 contenedores fueron positivos. En el cementerio de Amatitlán se revisaron 309 contenedores; 2 nichos y 16 contenedores fueron positivos. Esta evaluación fue independiente de la primera. Los índices obtenidos se muestran en las tablas 9 y 10.

Tabla 9: Índices aélicos del cementerio municipal de Villa Nueva. Diciembre del 2007.

Indicador entomológico	Resultado
Índice nicho (IC)	5.45 %
Índice recipiente (IR)	1.21 %
Índice Breteau (IB)	7.27 %

Tabla 10: Índices aélicos del cementerio municipal de Amatitlán. Diciembre del 2007.

Indicador entomológico	Resultado
Índice nicho (IC)	3.57%
Índice recipiente (IR)	5.18 %
Índice Breteau (IB)	28.57%

9. DISCUSIÓN

9.1. Selección del agente de control

Toxorhynchites ha mostrado ser un agente natural importante para regular las poblaciones de mosquitos en diferentes países (Lounibos, 1979; Gerber, 1985; Lounibos *et. al.*, 1987; Collins & Blackwell, 2000a; Aditya *et. al.*, 2006). Entre las razones por las cuales este depredador se ha convertido en un llamativo agente potencial de control biológico se pueden mencionar su facilidad de cultivo, la habilidad de las hembras de localizar contenedores con *Aedes aegypti*, la facilidad de aplicación por medio de su liberación, las altas densidades de la población en épocas de picos de abundancia del vector del dengue, su amplia distribución incluyendo regiones tropicales. Aunado a lo anterior, entre los lugares en los que se ha reportado su presencia se encuentran los cementerios (García, Castro y Rebollar, 1994; Collins & Blackwell, 2000; Vezanni, 2007).

Toxorhynchites grandiosus se relaciona con *Aedes aegypti*, debido a que presenta similares preferencias por contenedores artificiales con sombra y agua relativamente limpia, a diferencia de otras especies como *Culex fatigans* y *C. corniger*, que presenta preferencia por contenedores expuestos al sol y agua con altos grados de contaminación (Barrera *et. al.*, 1979).

9.2. Selección de los sitios de estudio

Los cementerios son considerados una importante fuente de mosquitos, habiéndose publicado más de 30 estudios sobre el tema durante las últimas décadas (Barrera *et. al.*, 1979; Vezanni, 2007). Entre las 31 especies reportadas, se han encontrado reproduciéndose algunas invasivas como *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, las cuales son las más comunes. También se han reportado especies del género *Culex* y *Toxorhynchites*, entre otras (Vezanni, 2007).

Los cementerios son hábitats muy adecuados para aquellos mosquitos que se reproducen en contenedores artificiales, debido a la disponibilidad de recursos que estos insectos requieren, tales como sustancias azucaradas, sangre, lugares de refugio y contenedores llenos de agua. Los cementerios son también lugares ideales para realizar estudios en áreas urbanas, allí se encuentran mosquitos en abundancia, macro y microhábitats heterogéneos, y son más accesibles que las propiedades privadas (Vezanni, 2007). Generalmente, en Guatemala los cementerios se encuentran ubicados en el centro o muy cerca de las comunidades, por lo que representan un foco que en parte del año es de alta producción del vector del dengue y puede afectar de gran manera a las comunidades aledañas a estos sitios.

Utilizando a *Toxorhynchites grandiosus* de manera correcta y en los sitios adecuados, puede llegar a convertirse en una gran ayuda para el personal del Ministerio de Salud, reduciendo los gastos y el tiempo que necesitan invertir en el control de *Aedes aegypti*.

9.3. Ciclo de vida de *Toxorhynchites grandiosus* en condiciones de laboratorio

Luego de la primera colecta de *Toxorhynchites grandiosus* se esperó dos meses hasta lograr la primera cópula y la primera oviposición en condiciones de laboratorio; este tiempo fue el necesario para que los mosquitos pudieran adaptarse a las nuevas condiciones a las que se les sometió.

Los especímenes obtenidos en la colonia de laboratorio presentaron un porcentaje de vida promedio de 39.73%, este porcentaje, comparado con los obtenidos en otros estudios, puede considerarse como alto. Sin embargo, en estudios, de otros autores, donde se midieron porcentajes de vida, solo se calcularon con base en censos periódicos realizados en contenedores naturales de *Toxorhynchites* y no de una población criada en laboratorio (Campos & Lounibos, 2000).

Durante el estudio se observaron varias cópulas y oviposiciones. De las oviposiciones obtenidas fue posible medir el porcentaje de huevecillos viables y no viables, el cual fue de 72.09% y 27.90% respectivamente. Distintos autores han relacionado la edad de la hembra con la viabilidad de los huevecillos de una manera inversa, hecho que pudo haber ocurrido en la presente investigación, sin embargo, no hubo posibilidad de medirlo (Collins & Blackwell, 2000a).

Para la oviposición fue necesario colocar recipientes negros con agua y larvas de *Aedes aegypti*; además de mantener, en épocas de frío, condiciones controladas de calor y humedad. La función de los recipientes de color negro fue estimular a las hembras para la oviposición; lo cual podría relacionarse con el espectro de absorción de la pintura negra que absorbe más luz y que podría ser del gusto de los mosquitos y parecerse a lo que tienen disponible en condiciones naturales (Collins & Blackwell, 2000b). Además, todos los especímenes fueron colectados en llantas y podría ser que *Toxorhynchites grandiosus* relacione los recipientes negros con el interior de llantas

Sobre el comportamiento depredador de *Toxorhynchites grandiosus*, se observó que las larvas son cazadoras feroces, que realizan ataques sorpresivos para capturar a su presa. El depredador agarra con las mandíbulas a la larva de *Aedes aegypti*, desde la cabeza o desde el sifón y lo ingiere completamente. Se observó que las L1 y L2 son capaces de cazar y consumir larvas del doble de su tamaño; mientras que las L3 y L4 ya presentan un tamaño mayor al de las L4 de *Aedes aegypti* (anexo 14). El feroz comportamiento depredador de las larvas y su gran capacidad de cazar, matar y consumir *Aedes aegypti*, hacen pensar que *Toxorhynchites grandiosus* puede llegar a convertirse en un efectivo agente de control biológico.

Una de las características generales que presentan los mosquitos de la Familia Culicidae y que fue observada en condiciones de laboratorio, fue la proporción de emergencia de machos y hembras, que se mantuvo en un porcentaje de 50% y 50%, con

pequeñas variaciones de 45% machos y 55% hembras (Triplehorn & Johnson, 2005). De donde se puede deducir que siempre se mantuvo una colonia equilibrada.

Si bien el vuelo de enjambre es una característica que ya ha sido reportada para otras especies de *Toxorhynchites*; en este caso no pudo ser observado, lo cual puede deberse al hecho de que no sea una característica de la especie, que el tamaño de la jaula fue muy pequeño para los vuelos o a la poca cantidad de adultos presentes en el cultivo (García, Castro & Rebollar, 1994).

El tiempo promedio en que se completó el ciclo de vida, desde la oviposición hasta la muerte del adulto, fue de 48 días. Este resultado se asemeja a la duración de los ciclos de vida de otras especies de *Toxorhynchites*, obtenidos en investigaciones realizadas tanto en condiciones de laboratorio como en condiciones de campo (Campos & Lounibos, 2000; Collins & Blackwell, 2000a; Badii *et. al.*, 2006). El cálculo del tiempo de vida obtenido en la investigación es importante ya que a partir de este dato se pueden hacer inferencias del momento indicado para la aplicación de *Toxorhynchites grandiosus* en distintos sitios y el tiempo necesario para separar varias aplicaciones, si fuera necesario.

Al principio de la investigación no fue fácil el montaje de la colonia en el laboratorio; sin embargo, conforme se fue avanzando en el estudio fue posible brindarle mejores condiciones a los especímenes colectados para que al final se tuviera una colonia con alta producción de *Toxorhynchites grandiosus*. Dentro de las condiciones que ayudaron más a mejorar la producción de la especie, se pueden mencionar los recipientes de color negro para la oviposición y las condiciones controladas de temperatura y humedad.

9.4. Potencial de *Toxorhynchites grandiosus* como agente de control biológico

Toxorhynchites grandiosus y otras especies del mismo género, han sido objeto de varios estudios. Se ha investigado sobre su biología, comportamiento y especialmente su potencial como agente de control biológico. Se han obtenido resultados importantes que

posicionan a *T. grandiosus* como organismos con alta capacidad para depredar, en estadio larval, larvas de otros mosquitos, especialmente de los géneros *Aedes* y *Culex*. A esto se suma el hecho de que en la fase adulta, las hembras y los machos se alimentan sólo de néctar y no de sangre, evitando ser vectores de enfermedades (Gerberg, 1985; Nelson, 1986; Collins & Blackwell, 2000a; Collins & Balckwell, 2000b; Lounibos & Campos, 2002; Aditya *et. al.*, 2006; Badii *et. al.*, 2006).

Las pruebas de control biológico en condiciones de laboratorio permitieron observar que las larvas de *Toxorhynchites grandiosus*, en todos sus estadios, pueden depredar de manera efectiva a las larvas de *Aedes aegypti*. A pesar de que no hubo una diferencia significativa en el número de presas muertas o ingeridas entre los estadios larvales, sí se pudo observar un incremento a medida que avanzaba el estadio larval del agente.

Los L4 de *Toxorhynchites grandiosus.*, para densidades de presas de 25 y 50 larvas, siempre mostraron ser el estadio que más presas consumió o mató; este hecho podría estar relacionado con sus requerimientos nutricionales pre-pupales y su comportamiento característico asesino de pre-pupa, en donde mata a la presa pero no la consume (Lounibos, 1979; Collins & Blackwell, 2000a) (anexo 15). Este tipo de comportamiento busca eliminar cualquier otro tipo de depredador que pueda encontrarse en el mismo ambiente acuático, antes de que la larva se convierta en una pupa vulnerable (Collins & Blackwell, 2000a); sin embargo, no se presenta en todas las especies del género *Toxorhynchites* (Steffan, 1975).

9.4.1. Impacto de depredación (PI) y rango de aclaración (CR)

La manera de determinar la capacidad de consumir del depredador a través de un período de tiempo, es por medio del impacto de depredación (PI) (Hampton, Gilbert & Burns, 2000; Aditya *et. al.*, 2006). El PI no tuvo una variación estadísticamente significativa. Sin embargo, en general, se observó cómo a medida que iba creciendo la larva, su valor de PI fue mayor, con pequeñas excepciones.

El L1 de *Toxorhynchites grandiosus* presentó un valor de PI un poco mayor que el L2, pero los valores fueron mayores para el L3 y aún más para el L4. El L4, con un valor de PI de 85, representa un agente de control biológico, en condiciones de laboratorio, con efectividad de casi el 100%, ésto puede ser atribuido al comportamiento de pre-pupa de la especie, donde aparte de consumir presas por sus requerimientos de nutrientes, entra en un estado asesino donde mata las presas pero no las consume (Lounibos, 1979; Collins & Blackwell, 2000a) (anexo 15).

En general, la depredación por artrópodos está regulada por ciertos factores comunes relacionados con la presa y las densidades del depredador o el tamaño de la presa y del depredador (Saha *et. al.*, 2007). El tamaño del depredador con relación al tamaño de la presa pudo haber tenido mucha relevancia en los valores de PI obtenidos, ya que se observó que los estadios con mayores valores de PI (L3 y L4) son del doble del tamaño que el L4 de *Aedes aegypti*, por lo que su depredación fue mayor. A parte del tamaño del depredador y de la presa, el comportamiento que adopta la presa en presencia de un depredador, también juega un papel importante; distintos estudios muestran que varias especies de *Aedes* pueden llegar a desarrollar, o no, un comportamiento de reposo en presencia de depredadores como *Toxorhynchites*, evitando de esta manera ser atacados por el agente (Juliano & Gravel, 2002; Kesavaraju & Juliano, 2004). Para la presente investigación, no se observó un cambio de comportamiento de *Aedes aegypti* en presencia de *Toxorhynchites grandiosus*, factor que contribuyó a una mayor depredación por parte del agente.

En cuanto al CR, éste representa el efecto combinado de la habilidad de buscar, matar y consumir del depredador y la evasión de la presa, en la unidad de tiempo y espacio (Gilbert & Burns, 1999; Aditya *et. al.*, 2006). Cuando los depredadores están presentes en números múltiples (3 depredadores, experimento 2) dentro de un área mayor, el rango de depredación incrementa, lo que es similar a situaciones naturales (Saha *et. al.*, 2007).

De los resultados obtenidos del CR, se observó que los L4 de *Toxorhynchites grandiosus* son eficientes en buscar y localizar las presas. Al igual que el PI, se observa un

incremento del CR a medida que avanza el estadio larval, lo cual se puede atribuir al comportamiento característico del último estadio larval (Lounibos, 1979; Collins & Blackwell, 2000a). Sin embargo, los valores de CR no variaron de gran manera, lo cual indica que en condiciones controladas (experimentos de laboratorio), *Toxorhynchites grandiosus* puede actuar como un agente efectivo de control biológico en todas sus fases larvianas.

Se observaron dos comportamientos importantes que deben considerarse para la aplicación de *Toxorhynchites grandiosus* como agente de control biológico. El primero, es el canibalismo, el cual se presentó en todos los estadios y depende de la densidad y el comportamiento de la presa, su tamaño en relación a las larvas del agente y el número de lugares para ocultarse en el contenedor (Collins & Blackwell, 2000a) (anexo 16). El canibalismo fue un factor que pudo haber reducido los valores de CR del depredador y por lo tanto reducir su eficacia como control biológico.

El segundo fue la capacidad de las larvas de cuarto estadio de consumir y matar pupas de *Aedes aegypti*, lo que lo convierte en pupicida además de larvicida. Esta selección de presa ya ha sido reportada en condiciones naturales (Lounibos, 1979) (anexo 17). El comportamiento pupicida es un factor importante que garantiza el control de fases del vector que logren alcanzar el estadio de pupa. Por lo que *Toxorhynchites grandiosus* podría ayudar en estos casos y se debe tomar en cuenta a la hora de aplicar el control biológico.

9.5. *Toxorhynchites grandiosus* como agente de control biológico en condiciones de campo.

9.5.1. Condiciones adversas a las pruebas de campo realizadas.

Para llevar a cabo las pruebas de control biológico en condiciones de campo fue necesario esperar un tiempo prudencial, debido al hecho de que el MSPAS ya había

realizado la aplicación de un control químico en los sitios de estudio. Por esta razón la primera evaluación entomológica se realizó durante la segunda semana del mes de noviembre del año 2007. De los resultados de la primera evaluación entomológica, se observaron índices relativamente bajos para ambos cementerios, lo cual puede estar relacionado con la época en la cual se realizaron las evaluaciones, que son épocas que presentan climas fríos y secos.

Aparte del comportamiento de la especie, la época en que se aplicó *Toxorhynchites grandiosus* en los cementerios jugó un papel importante en la efectividad de este tipo de control. Por lo regular, en las regiones tropicales con una época lluviosa bien marcada, como en el caso de Guatemala, la población de mosquitos prolifera durante todo el año pero presenta picos de abundancia durante los meses húmedos (Barrera *et. al.*, 1979; Schultz, 1989; Schultz, 1993). En este caso la época en que se realizó la investigación presentó un clima seco y frío, si se aplicara en épocas de lluvia, talvez podría ser más evidente la efectividad que tiene *Toxorhynchites grandiosus* como depredador de larvas de *Aedes aegypti* y por lo tanto su efectividad como control biológico.

9.5.2. Resultados esperados y resultados obtenidos.

Luego de realizar las primeras evaluaciones entomológicas, el IC en el cementerio de Villa Nueva (tabla 7), fue de 5.45%, lo cual indica que el vector no se encontraba ampliamente distribuido. El IR presentó un valor menor al IB indicando que el problema se encontraba focalizado y que dentro del sector evaluado había un foco de intensa reproducción (Programa Nacional de Vectores, 2001).

A pesar de que en los nichos en los que se introdujeron larvas de *Toxorhynchites grandiosus* no hubo una diferencia significativa en la cantidad de presas muertas o consumidas, sí se contabilizó, de manera directa, diferentes promedios de presas consumidas. El nicho 2, presentó un promedio mayor, lo cual puede estar relacionado con las características del nicho (mayor área y/o con sombra y mayor densidad de presas). El

nicho 3, que presentó el menor promedio pudo deberse a que presentaba mayor cantidad de pupas que de larvas de *Aedes aegypti*; a pesar de que las larvas del depredador son capaces de consumir pupas de la presa, tienen preferencias por larvas, lo cual pudo reducir la cantidad de presas disponibles para el depredador.

El nicho 1, con un hábitat mucho más pequeño que el 2, presentó una menor densidad de presas y por lo tanto, el promedio de presas consumidas fue menor. Durante el transcurso de las pruebas de control biológico en condiciones de campo, se logró observar una reducción en la población de larvas de *Aedes aegypti*.

A pesar de que en el cementerio de Amatitlán se habían aplicado dos tipos de control químico (larvicida Temefos (abate) y fumigación de insecticidas), previo al control biológico, los índices aélicos (tabla 8), presentaron un IC de 3.57%, ésto indica que al igual que en el cementerio de Villa Nueva, el vector no se encontraba ampliamente distribuido. El IR presentó un valor menor al IB, indicando también un problema focalizado, con un foco de intensa reproducción en el sector trabajado (Programa Nacional de Vectores, 2001). A partir del IC, se asumió que por lo menos 20 nichos del cementerio se encontraban positivos, según este resultado y debido a que en el momento en que se realizó la liberación de adultos, no se contaba con una alta producción en la colonia de laboratorio, se liberaron 15 hembras y 5 machos adultos de *Toxorhynchites grandiosus*; esperando que las hembras liberadas ovipusieran en más de un contenedor positivo; por su comportamiento característico de oviponer en varios contenedores a la vez (Chadee, Small & O'Malley, 1987; Collins & Blackwell, 2000a). Se liberaron machos además de hembras esperando que hubiera cópula y reproducción de la especie en el sitio de estudio, suponiendo la posibilidad de que algunas hembras estuvieran vírgenes todavía.

La segunda evaluación entomológica se realizó un mes después, esperando que *Toxorhynchites grandiosus* completara su ciclo de vida. A partir de esta evaluación se determinó que el IC en el cementerio municipal de Villa Nueva se mantuvo en 5.4%, el IR y el IB fueron menores a los valores obtenidos en la primera evaluación entomológica, pero

siempre indicando un problema focalizado. A pesar de que no hubo una reducción en el grado de infestación, tampoco hubo un aumento en éste. En el cementerio de Amatitlán, también se obtuvo un IC igual al obtenido en la primera evaluación (3.5%). Los valores de IR e IB volvieron a presentar un problema focalizado y con un foco de intensa reproducción. En este caso también se pudo observar que se mantuvo el grado de infestación.

Cuando se realizan pruebas de control biológico en condiciones de campo, se deben tener en cuenta muchos aspectos, antes de aceptar o rechazar nuevos métodos o nuevos agentes de control. Para el caso de *Toxorhynchites grandiosus* se debe tener en cuenta ciertos aspectos de su comportamiento para poder utilizarlo efectivamente. Por ejemplo, tiene preferencias por ciertos taxa como presas y su dieta es dependiente del hábitat donde se encuentra. En un hábitat natural, las larvas de *Toxorhynchites* habitan en un ensamble de especies, donde puede variar de gran manera su dieta, según la variedad de presas que se le puedan presentar. Este hecho hace que no consuman tantas larvas de *Aedes aegypti* como se observa en condiciones de laboratorio, donde la única presa disponible eran larvas de esta especie. En los contenedores o floreros de los nichos es frecuente encontrar diferentes especies del género *Culex*, que también son activos nadadores y son propensos a los ataques de emboscada de *Toxorhynchites*, lo que reduce la cantidad de larvas de *Aedes aegypti* que el depredador podría consumir (Lounibos *et. al.*, 1987).

De los dos métodos utilizados para realizar las pruebas de control biológico, se observó que el método de liberación de adultos fue el de más fácil aplicación, debido a que no es necesario buscar los nichos positivos para aplicar directamente el agente. La razón por la cual se realizó el método de aplicación directa en los nichos fue para observar si efectivamente, *Toxorhynchites grandiosus*, tenía algún efecto sobre la población de *Aedes aegypti* en el sitio de estudio, el cual sí pudo ser observado. Sin embargo, si en un momento dado, se llegará a aplicar este tipo de control biológico, se debe realizar por el método de liberación y no por el de aplicación directa, ya que lo que se esperaría es que *Toxorhynchites grandiosus*, identifique y oviponga por sí solo en los contenedores que se

encuentren positivos en el cementerio, reduciendo así significativamente la carga de trabajo del personal del MSPAS y logrando su adaptación y desarrollo en estos sitios.

Distintos estudios sugieren que serían necesarias liberaciones de *Toxorhynchites* (los estadíos e intervalos dependientes de las condiciones del hábitat y el ambiente), para alcanzar un mayor nivel en el control del mosquito del dengue, y además para incrementar las poblaciones naturales disminuidas por las sequías (Lounibous & Campos, 2002). Aparte de considerar la forma de aplicación del agente en condiciones de campo, también es necesario considerar varias aplicaciones del mismo y la producción masiva para poder llevar a cabo las distintas aplicaciones.

La capacidad de carga K, es otro aspecto que debe ser tomado en cuenta a la hora de aplicar el control. El cual es el número máximo de organismos de una especie tolerables por el sistema. En una gráfica es el punto donde se “acuesta” la curva y que se ve determinada muchas veces por la disponibilidad de comida, el número de depredadores, número de bichos del sexo opuesto, número de “casas” habitables, etc. (Shark, 2006). Varios estudios han considerado la K, como un factor importante para determinar la efectividad del agente de control biológico sobre el organismo que se desea controlar (Portillo, 2002; Castelo & Corley, 2004; Aparicio, Solari & Bonino, 2006) En este caso no se sabe cuál es la capacidad de carga de *Aedes aegypti* en los cementerios de Villa Nueva y Amatitlán (los sistemas). Se asume que la cantidad de *Toxorhynchites grandiosus* liberados en ambos cementerios no fue la cantidad ideal para tener alguna influencia sobre la K del mosquito vector del dengue en los cementerios. Sabiendo la capacidad de carga del *A. aegypti* en un sistema dado, se puede inferir de mejor manera en la cantidad de larvas y/o adultos del agente que son necesarios, para reducir de manera significativa las poblaciones del mosquito.

En ambos casos, se podría decir que el control biológico, en condiciones de campo, utilizando mosquitos del género *Toxorhynchites*, no pudo ser evidente, lo cual podría deberse, a la época en que se realizaron las evaluaciones y las pruebas de control biológico.

Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos en laboratorio es muy importante continuar con estudios en este campo utilizando colonias más numerosas, cultivadas en las áreas de salud donde pueden ser utilizadas, para poder integrar este tipo de control biológico a un plan integrado donde se mezclen diferentes tipos de control para larvas del vector del dengue.

10. CONCLUSIONES

1. Debido a los bajos índices presentes en los cementerios, resultado de la época en que se realizaron las evaluaciones entomológicas, no se logró comprobar la eficacia del mosquito en los sitios de estudio.
2. *Toxorhynchites grandiosus*, puede ser exitosamente cultivado en laboratorio, en condiciones controladas de temperatura y humedad.
3. En condiciones controladas de laboratorio, todos los estadios larvales de *Toxorhynchites grandiosus*, son agentes efectivos de control biológico sobre las fases larvales de *Aedes aegypti*.
4. Los valores obtenidos del impacto de depredación (PI) y del rango de aclaración (CR), de los depredadores sobre las presas, fueron mayores a medida que avanzaban los estadios larvales de *Toxorhynchites grandiosus*.
5. El cuarto estadio de *Toxorhynchites grandiosus* presentó mayor efectividad como agente de control biológico sobre las fases larvales de *Aedes aegypti*, con porcentajes de PI que fueron del 85 al 100%.

11. RECOMENDACIONES

1. Continuar con las investigaciones sobre el potencial que tienen los estadios larvales de mosquitos del género *Toxorhynchites* como agentes de control biológico sobre los estadios larvales de *Aedes aegypti*, vector del dengue, en espacios abiertos como cementerios, sitios baldíos, etc.
2. Realizar pruebas de control biológico en condiciones de campo, en épocas de explosión del mosquito vector del dengue (comienzo de la época lluviosa).
3. Realizar más estudios sobre el ciclo de vida y el desarrollo de todos los estadios de mosquitos del género *Toxorhynchites*, en condiciones de laboratorio, para generar un protocolo de mantenimiento de una colonia de esta especie con el fin de mejorar su producción en cautiverio.
4. Probar la efectividad de *Toxorhynchites grandiosus* como agente de control biológico en áreas donde se encuentre esta especie.
5. Introducir nuevos agentes de control biológico junto con los habituales tipos de control, aplicados por el personal de la sección de vectores del Ministerio de Salud y Asistencia Social, para el vector del dengue *Aedes aegypti* y de esta manera lograr una reducción significativa de las poblaciones del mosquito.

12. REFERENCIAS

1. Aditya G, Ash A & Saha GK. 2006. Predatory activity of *Rhantus sikkimensis* and larvae of *Toxorhynchites splendens* on mosquito larvae in Darjeeling, India. Journal Vector Borne Disease, Vol. 43: 66-72.
2. Aparicio, JP. Solari, HG & Bonino, NA. 2006. Perspectivas teóricas sobre la dinámica de la mixomatosis con aplicaciones en control biológico. Journal Ecología Austral, Vol. 16: 15-28.
3. Badii, M. Garza, V. Landeros, J. & Quiroz, H. 2006. Diversidad y Relevancia de los Mosquitos. *CULCyT/Bionomía*. México, Vol. 3(3): 4-16.
4. Barrera R, Machado CE & Bulla LA. 1979. Criaderos, densidad larval y segregación de nicho en tres culicidae urbanos (*Culex fatigans*, *C. corniger* y *Aedes aegypti*) en el cementerio de Caracas. Acta Científica Venezolana, Vol. 30: 418-424.
5. Bay CE, et. al. 1973. Mosquito Control Some Perspectives for Developing Countries. National Academy of Science. Washington, Estados Unidos. 52 pp.
6. Birley MH. 1992. Directrices para Prever las Consecuencias de las Obras de Desarrollo de los Recursos Hídricos en Cuanto a las Enfermedades Transmitidas por Vectores. Centro Colaborador de la OMS en Ordenamiento del Medio para la Lucha Antivectorial. Departamento de Entomología Médica. Escuela de Medicina Tropical de Liverpool, Inglaterra. 120 pp.
7. Campos RE & Lounibos LP. 2000. Life Tables of *Toxorhynchites rutilus* (Diptera: Culicidae) in Nature in Southern Florida. Journal of Medical Entomology. Estados Unidos, Vol. 37(3): 385-392.
8. Castelo, MK & Corley, JC. 2004. Evaluación de la capacidad reguladora del moscardón cazador de abejas *mallophora ruficauda* (diptera: asilidae) sobre los gusanos blancos del suelo (coleoptera: scarabaeidae). Argentina. RIA, Vol. 33(1): 61-80.
9. Castillo, C. 2000. Boletín Epidemiológico: Análisis de la Situación de Salud en las Américas, 1999-2000. Programa especial de análisis de salud, Organización Panamericana de la Salud. Estados Unidos, Vol. 21(4): 1-16.

10. Centro Nacional de Epidemiología. 2007. Semana Epidemiológica; Situación de los Principales Eventos de Vigilancia Epidemiológica. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Guatemala. 5 pp.
11. Chadee, D., Small, G. & O'Malley, S. 1987. The Description of the eggs of *Toxorhynchites moctezuma* (Diptera: Culicidae) from Trinidad, West Indies, with notes on other eggs. Mosquito Systematics, Vol. 19(3): 237-242.
12. Chiparelli, H. & Schelotto, F. 1999. Dengue, una enfermedad emergente muy cerca de nuestro país. Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay. 8 pp.
13. Clark S & Darsie F. 1983. The Mosquitoes of Guatemala, their identification, distribution and bionomics. Mosquito Systematics; Vol. 15(3): 151-284.
14. Collins, L. & Blackwell, A. 2000a. The Biology of *Toxorhynchites* mosquitoes and their potential as biocontrol agents. Biocontrol/News and Information, Inglaterra, Vol. 21(4): 105N – 116N.
15. Collins, L. & Blackwell, A. 2000b. Color cues for oviposition behaviour in *Toxorhynchites moctezuma* and *Toxorhynchites amboinensis* mosquitoes. Journal of Vector Ecology. 9 pp.
16. Darsie, R. & Morris, C. 2000. Keys to the adult females and fourth-instars larvae of the mosquitoes of Florida (Diptera, Culicidae). Technical bulletin of the Florida Mosquito Control Association, Volume 1. USA. 159 pp.
17. Diéguez, L. Avelar, C. Pérez, R. & Salazar, V. 2006. Contribución al estudio de la familia Culicidae de Guatemala: Relación y distribución geográfica de las principales especies de la región norte. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala. Policlínico docente “Ignacio Agramante” de Camagüey. Revista Cubana de Medicina Tropical, Vol. 58(1): 30-35.
18. Domínguez, K. 2000. Producción y estandarización en citocultivadores manuales del antígeno de dengue para su uso en el método de EIA de membrana. Tesis de Químico Biólogo de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. 52 pp.

19. Foster, W.A. & Walker, E.D. 2002. Medical and Veterinary Entomology, Mosquitoes (Culicidae). Editores Gary Mullen & Lance Durden. Academic Press, Elsevier Science, San Diego, California, Estados Unidos. 203-262 pp.
20. García JA, Castro JA & Rebollar E. 1994. Comportamiento diario de *Toxorhynchites theobaldi* (Diptera: Culicidae) bajo condiciones de laboratorio. Biotam, Vol. 6(2):1-8.
21. Gerber EJ. 1985. Sequential biocontrol application in the use of *Toxorhynchites spp.* Academic Press, Londres, Inglaterra. 33-46 pp.
22. Gilbert J & Burns C. 1999. Some observations on the diet of the backswimmer, *Anisops wakefieldi* (Hemiptera: Notonectidae). Hydrobiology, Vol. 412: 111-118.
23. Guzmán Tirado, M. Kouri Flores, G. Ramón, J. 1999. La emergencia de la fiebre hemorrágica del dengue en las Américas. Reemergencia del dengue. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Revista Cubana de Medicina Tropical, Vol. 51(1): 5-13.
24. Goma, L. 1966. The Mosquito. Hutchinson Tropical Monographs. Hutchinson & C.O. LTD. Anchor Press. Londres, Inglaterra. 48-66 pp.
25. Hampton S, Gilbert J & Burns C. 2000. Direct and indirect effects of juvenile *Buenoa macrotibialis* (Hemiptera: Notonectidae) on the zooplankton of a shallow pond. Limnology and Oceanography, Vol. 45(4): 1006-1012.
26. Ibáñez, S. & Gómez, H. 1995. Los Vectores del Dengue en México: Una Revisión Crítica. Salud Pública, México, Vol. 37: 53-63.
27. Juliano S. A. & Gravel M. E. 2002. Predation and the Evolution of Prey Behavior: An Experiment with Tree Hole Mosquitoes. Behavioral Ecology, Vol. 13(3): 301-311.
28. Kesavaraju B. & Juliano S. A. 2004. Differential Behavioral Responses to Water-Borne Cues to Predation in Two Container-Dwelling Mosquito. Ann. Entomol. Soc. Am. Vol. 97(1): 194-201.
29. Lounibos, L. P. 1979. Temporal and spatial distribution, growth and predatory behavior of *Toxorhynchites brevipalpis* (Diptera: Culicidae) on the Kenya Coast. Journal of Animal Ecology, Vol. 48: 213-236.

30. Lounibos, L. P. Frank, J. H. Machado Allison, C. E. Ocanto, P. & Navarro, J. C. 1987. Survival, development and predatory effects of mosquito larvae in Venezuelan phytotelmata. *Journal of Tropical Ecology*, Vol. 3: 221-242.
31. Lounibos, P. & Campos R. 2002. Investigaciones recientes sobre *Toxorhynchites rutilus* (Díptera: Culicidae) con referencia al control biológico de mosquitos habitantes en recipientes. *Entomotrópica* (Antes: Boletín de Entomología Venezolana), Vol. 17(2): 145-156.
32. Lújan, R. Torres, O. Haeussler, C. Hernández. Z. Hernández, J. 2004. Desarrollo y validación de una estrategia comunitaria para la reducción del riesgo de Dengue y Diarrea en ecosistemas urbanos de la frontera de Guatemala con el sur de México. Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá, Guatemala. 62 pp.
33. Nelson MJ. 1986. *Aedes aegypti*: Biología y Ecología. Organización Panamericana de la Salud, Washington, Estados Unidos. 50 pp.
34. OPS. 1982. Control de vectores con posteridad a los desastres naturales. Publicación científica No. 149. Washington, Estados Unidos. 104 pp.
35. OPS. 1998. Segundo Informe: Situación de las enfermedades infecciosas de mayor riesgo epidemiológico en el período post-Mitch, países de Centroamérica. Segundo informe. Organización Panamericana de la Salud, División Prevención y control de Enfermedades, Programa de Enfermedades Transmisibles. Washington, Estados Unidos. 440-443 pp.
36. OPS. 2007. Dengue en las Américas; Situación Actual. Organización Panamericana de la Salud; Programa Regional de Dengue, 2007. 8 pp.
37. Parks W & Lloyd L. 2004. Planificación de la Movilización y Comunicación Social para la Prevención y el Control del Dengue. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. 141 pp. (p. 1-17).
38. Ponce G, Flores A, Baddi M, Fernández I, González T, Rodríguez M & Chiu J. 2003. Evaluación de *Bacillus thuringiensis isaraelensis* (VECTOBAC 12 Asâ) sobre la Población Larval de *Aedes aegypti* en el Área Metropolitana de Monterrey N. L. *Rev. Salud Pública y Nutrición*, México, Vol. 4(3).

39. Portillo, E. 2002. Control biológico del *fouling* en tanques de cultivo de macroalgas mediante el gasterópodo *Osilinus atratus* (Wood, 1828). Journal Bol. Inst. Esp. Oceanogr. Vol. 18(1-4): 401-404.
40. Programa Nacional de Vectores. 2001. Manual operativo de vigilancia y control entomológico de *Aedes aegypti*, vector del dengue en Guatemala. Dirección general de regulación, vigilancia y control de la salud. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Guatemala. 1-5 pp.
41. Reyes F. 1990. El Dengue, Bionomía del vector, transmisión y opciones para su control en México. Ciencia, México, Vol. 41: 45-55.
42. Rodríguez J. García I, Menéndez Z, García I, Eladio J & Pérez R. 2005. Efecto Patogénico de 3 Nemátodos Parásitos en larvas de *Aedes aegypti* en Condiciones de Laboratorio, en Cuba. Rev. Cubana Med. Trop. Vol. 57(3).
43. Rossi, G. & Almirón, W. 2004. Clave Ilustrada para la Identificación de Larvas de Mosquitos de Interés Sanitario Encontradas en Criaderos Artificiales en la Argentina. Fundación Mundo Sano, Buenos Aires, Argentina. 31-33 pp.
44. Saha, N. Aditya, G. Bal, A. & Kumar, G. 2007. A comparative study of predation of three aquatic heteropteran bugs on *Culex quinquefasciatus* larvae. The Japanese Society of Limnology. Limnology, Vol. 8: 73-80.
45. Salvatella, R. 1996. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) y su Papel Como Vectores en las Américas; la Situación de Uruguay. Rev. Med. Uruguay, Vol. 12: 28-36.
46. Schultz GW. 1989. Cemetery vase breeding of dengue vectors in Manila, Republic of the Philippines. Journal of the American Mosquito Control Association, Vol. 5: 508-513.
47. Schultz GW. 1993. Seasonal abundance of dengue vectors in Manila, Republic of the Philippines. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, Vol. 24: 369-375.
48. Shark, GW. 2006. Las Limitaciones y Exageraciones del Control Biológico. España. Dr. Pez, No. 1024. http://1024.drpez.com/julio_06/control.htm.

49. Sistema de Información Gerencial de Salud. Estadísticas de Salud; Enfermedades de Notificación Obligatoria. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Guatemala. 1p.
50. Steffan, W.A. 1975. Systematics and biological control potential of *Toxorhynchites* (Diptera: Culicidae). Mosquito Systematics, Vol. 7(1): 59-68.
51. Suárez S, Rodríguez J, Menéndez Z, Montada D, García I & Marquetti M. 2005. *Macrocylops albidus* (Copepoda: Cyclopidae): Una Nueva Alternativa para el Control de Larvas de Mosquitos en Cuba. Rev. Cubana Med. Trop. Vol. 57(3).
52. Tabaru Y, Monroy C, Rodas A, Mejía M, Pichilla R, Mauricio H & Pérez M. 1998. Distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Guatemala, Following Colonization in 1995. Med. Entomol. Zool. Vol. 49(4): 331-336.
53. Triplehorn, C. & Johnson, N. 2005. Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects. Editorial Thomson Brooks/Cole, California, Estados Unidos. 864 pp.
54. Vargas, M. 2003. Uso de peces larvívoros como controladores biológicos de larvas de *Aedes aegypti*: Una participación comunitaria. Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Rev. Col. De MQC de Costa Rica, Vol. 9(9): 1-5.
55. Vezzani D. 2007. Review: Artificial container breeding mosquitoes and cemeteries; a perfect match. Tropical Medicine and International Health, Vol. 12(2): 299-313.
56. WHO. 1987. Tropical Disease Research: A Global Partnership. UNDP/World Bank/WHO, Special Program for Research and Training in Tropical Disease.

13. ANEXOS

1. Fotografía tomada en fase de campo.



Figura 4: Ilanteras de Barberena, Santa Rosa donde se realizaron colectas del mosquito *Toxorhynchites grandiosus*. Autor: Carlos Montenegro.

2. Fotografía tomada en el Bioterio del LENAP. Fase de laboratorio. (Siguiete página).



Figura 5: Fotografía de los Recipientes negros, para que hubiera oviposición de *Toxorhynchites grandiosus*, en condiciones de laboratorio. Autor: Carlos Montenegro.

3. Fotografía tomada en el Bioterio del LENAP. Fase de laboratorio.

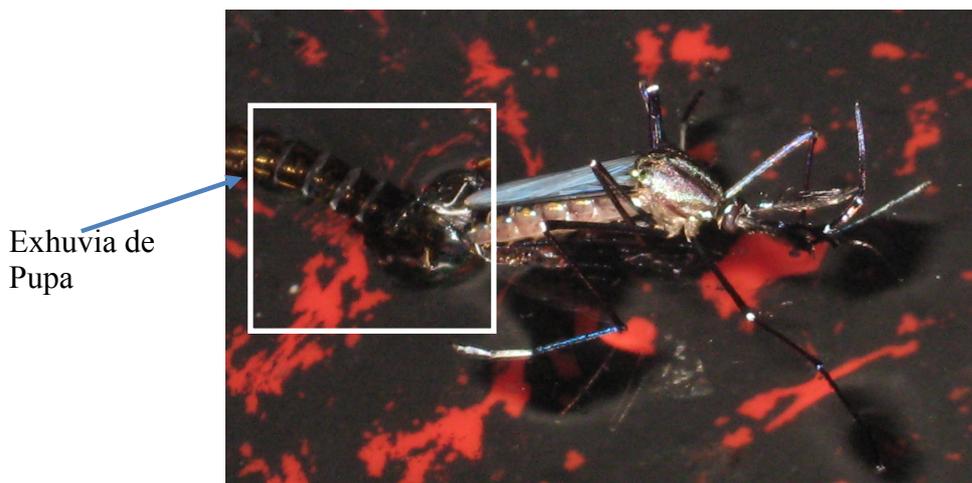


Figura 6: Fotografía de la emergencia de un macho de *Toxorhynchites grandiosus*. Autor: Carlos Montenegro.

4. Fotografía tomada de la colección de referencia, que se encuentra en el LENAP.



Figura 7: Colección de referencia de *Toxorhynchites grandiosus*, realizada con los especímenes que murieron en el transcurso de la investigación. Autor: Carlos Montenegro.

5. Número de casas (nichos) que se debería inspeccionar para detectar infestación con larvas de *Aedes aegypti*. (OMS 1995) (Programa Nacional de Vectores, 2001).

Número de casas en la localidad	Índice de viviendas verdadero		
	>1%	>2%	>5%
100	95	78	45
200	155	105	51
300	189	117	54
400	211	124	55
500	225	129	56
1000	258	138	57
2000	277	143	58
5000	290	147	59
10000	294	148	59
Infinito	299	149	59

7. Fotografía tomada en el Bioterio del LENAP. Fase de laboratorio.



Figura 8: Huevos viables de *Toxorhynchites grandiosus*. Autor: Carlos Montenegro.

8. Fotografía tomada en el cementerio de Villa Nueva. Fase de campo.



Figura 9: Primera evaluación entomológica en el cementerio de Villa Nueva. Autor: Vivian Monzón.

9. Fotografía tomada en el cementerio de Amatitlán. Fase de campo.



Figura 10: Primera evaluación entomológica en el cementerio de Amatitlán. Autor: Carlos Montenegro.

10. Fotografía tomada en el cementerio de Villa Nueva. Fase de campo.



Nicho positivo No. 1



Nicho positivo No. 2.



Nicho positivo No. 3.

Figura 11: Tres nichos positivos del cementerio de Villa Nueva, resultado de la primera evaluación entomológica. Autor: Carlos Montenegro y Vivian Monzón.

11. Fotografía tomada en el cementerio de Amatitlán. Fase de campo.

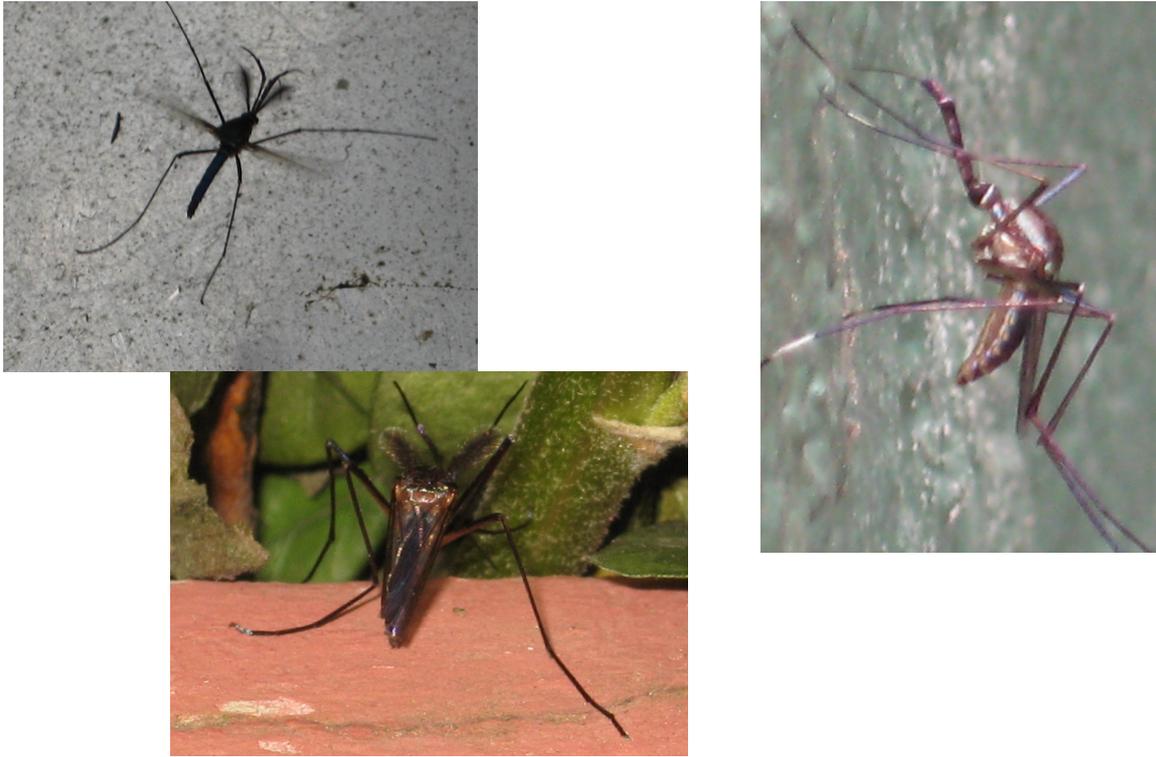


Figura 12: Pruebas de control biológico por medio de la liberación de adultos del mosquito *Toxorhynchites grandiosus*, en el cementerio municipal de Amatitlán. Autor: Carlos Montenegro.

12. Fotografía Tomada en el cementerio de Villa Nueva. Fase de campo. (Siguiete página).



Figura 13: Segunda evaluación entomológica realizada en el cementerio de Villa Nueva.
Autor: Carlos Montenegro.

13. Fotografía tomada en el cementerio de Amatitlán. Fase de campo.



Figura 14: Segunda evaluación entomológica realizada en el cementerio de Amatitlán.
Autor: Carlos Montenegro.

14. Fotografía tomada en el Bioterio del LENAP. Fase de laboratorio.



Larva de segundo estadio.



Larva de primer estadio.



Larva de tercer estadio.



Larva de cuarto estadio.

Figura 15: Larvas de primer y segundo estadio de *Toxorhynchites grandiosus*, capaces de cazar presas del doble de su tamaño. Larvas de tercer y cuarto estadio de *Toxorhynchites grandiosus*, del doble del tamaño de su presa. Autor: Carlos Montenegro.

15. Fotografía tomada en el Bioterio del LENAP. Fase de laboratorio. (Siguiete página).



Figura 16: Comportamiento asesino de pre-pupa, observado en las larvas de cuarto estadio de *Toxorhynchites grandiosus*. Autor: Carlos Montenegro.

16. Fotografía tomada en el Bioterio del LENAP. Fase de laboratorio.



Figura 17: Comportamiento de canibalismo ente las larvas de *Toxorhynchites grandiosus*. Observado en condiciones de laboratorio. Autor: Carlos Montenegro.

17. Fotografía tomada en el Bioterio del LENAP. Fase de laboratorio.



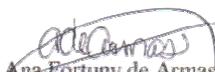
Figura 18: Comportamiento observado de pupicida por parte de larvas de *Toxorhynchites grandiosus*. Autor: Carlos Montenegro.



Carlos Alberto Montenegro Quiñonez
AUTOR



Licda. Mariamela Menes Hernández
ASESORA



Licda. Ana Fortuny de Armas
REVISORA



Licda. Rosalito Barrios de Rodas
DIRECTORA



Ph. D. Oscar Cobar Pinto
DECANO