

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

Evaluación de diferentes cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin como potenciales agentes para el control de *Triatoma dimidiata* Latreille (Reduviidae: Triatominae).



Sayra Beatriz Chanquin Avendaño

Bióloga

Guatemala, octubre de 2009

JUNTA DIRECTIVA

Lic. Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.	Vocal I
Licda. Lilibian Magalí Videz de Urizar	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. María Estuardo Guerra Valle	Vocal IV
Br. Brenda Alejandra Morales Mérida	Vocal V

DEDICATORIA

A DIOS

Por mostrarme cada día su amor, en las cosas simples y cotidianas de la vida. *Padre Nuestro, te pido que el Espíritu Santo que guió a Jesús sea mi guía y mi fuerza.*

A MIS PADRES

Rosa Beatriz Avendaño de Chanquín
Francisco Nery Chanquín Rodríguez

Por su amor, cuidados y consejos para mi vida. Estoy consciente que gracias a sus esfuerzos y apoyo incondicional estoy alcanzando mis metas.

A MI HIJA

Luisa Fernanda Hernández Chanquin

Flaca linda este logro es por ti, porque sos mi inspiración para levantarme todos los días y establecerme nuevos retos. ¡QUÉ BENDICIÓN! ¿A quién quiero yo?

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso por darme vida, sabiduría y fuerza para culminar mis estudios.

Durante esta extendida experiencia universitaria y la conclusión del trabajo de tesis, ha habido personas que merecen una mención debido a que algunos han plasmado una huella en mi camino y otros por su valiosa aportación en este trabajo.

A toda mi familia, mis padres por propiciar mi superación académica; en especial a mi madre por cubrirme muchas veces en el trabajo más lindo, ser madre. A mi hija, por permitirme crecer, por su paciencia y comprensión; en especial en aquellos momentos que el tiempo era para ella. Además, por ayudarme muchas veces a alimentar a las chinches. A mis hermanos por compartir penas y alegrías conmigo, además de brindarme su ayuda y apoyo; te quiero Chanks. Gracias tía Chatía por tus oraciones.

A Eunice Enríquez por la confianza y asesoría para formar parte de este proyecto. Así como, al Dr. Jesús Bulux por brindarme la dirección y apoyo en la realización del informe final.

A Sergio Melgar y Antonieta Rodas por sus valiosos comentarios en la revisión de este trabajo. De igual manera a Dulce, Marianela y Bárbara por su amistad y apreciables aportes a este trabajo.

Al Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología –LENAP-, por abrirme el espacio para el desarrollo de la investigación y contribuir en gran medida a mi formación profesional. A mis amigos y amigas del lab. por hacer de cada dificultad un momento efímero. Siempre disfruto su compañía.

Al personal del Laboratorio Microbiológico de Referencia –LAMIR-y del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, por brindarme un espacio y compartir sus conocimientos.

A la Sección de Entomología Médica y al personal de Enfermedades Transmitidas por Vectores de las Áreas Salud del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social –MSPAS-, por facilitar triatominos. A. Ronald Estrada y Conchita Toriello por brindar desinteresadamente las cepas de hongos utilizados y compartir su experiencia.

A Kari, Paty, Ricardo y Marvín por echarme siempre una mano con los ratones.

A mis profesores, que compartieron sus conocimientos conmigo. Especialmente a Julieta Pezzarossi (Q.E.P.D.), Roselvira Barillas, Fernando Díaz, Samuel Córdova y Jaime Juárez, quienes además siempre tuvieron un momento, conversaciones enriquecedoras y palabras de apoyo.

A las súper asistentes Sandrita, Almita y Normita, por su cariño y ayuda a lo largo de mi carrera.

A todos mis amigos y amigas pasados y presentes; los pasados por ayudarme a crecer y madurar como persona y los presentes por estar siempre conmigo apoyándome en todas las circunstancias posibles. A cada uno de ustedes, gracias por ser parte de esta alegría; prefiero no dar nombres para no omitir a ninguno.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	3
3. ANTECEDENTES	5
3.1. Enfermedad de Chagas	5
3.2. Agente etiológico ..	6
3.3. Vector	7
3.3.1. <i>Triatoma dimidiata</i> (Latrielle)	8
3.3.1.1. Clasificación taxonómica y distribución geográfica	8
3.3.1.2. Descripción	9
3.3.1.3. Biología	10
3.3.1.4. Huésped	10
3.4. Métodos de Control de Triatominos	11
3.4.1. Control Químico	12
3.4.2. Control Físico	14
3.4.3. Control Cultural	14
3.4.4. Control Legal	15
3.4.5. Control Biológico	16
3.4.6. Control Integral	17
3.5. Hongos Entomopatógenos	17
3.5.1. Clase Hyphomycetes	19
3.5.2. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos	19
3.5.2.1. Adhesión al tegumento	20
3.5.2.2. Germinación del conidio	20
3.5.2.3. Penetración por la cutícula	21
3.5.2.4. Replicación en el hemocele	22
3.5.2.5. Producción de toxinas	23
3.5.2.6. Muerte del hospedero	24
3.5.2.7. Emergencia del micelio y esporulación	24
3.6. Características de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill.....	24

3.7. Características de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metch.) Sorokin	25
4. JUSTIFICACION	26
5. OBJETIVOS	28
6. MATERIALES Y MÉTODOS	29
6.1. Universo	29
6.1.1. <i>Triatoma dimidiata</i>	29
6.1.2. Hongos entomopatógenos	29
6.2. Métodos	30
6.2.1. Reactivación de los hongos entomopatógenos	30
6.2.2. Producción masiva de los hongos	30
6.2.3. Obtención de los inóculos	30
6.2.4. Selección de aislamientos más promisorios	31
6.2.5. Viabilidad de la cepa no patogénicamente activa	32
6.2.6. Evaluación de las cepas seleccionadas	32
6.2.7. Confirmación de micosis.....	33
6.3. Análisis estadístico	33
6.3.1. Tiempo letal medio (TL ₅₀)	34
6.3.2. Concentración letal media y noventa (CL ₅₀ y CL ₉₀)	34
6.3.3. Susceptibilidad por el estadio de desarrollo y efecto de la concentración.....	34
7. RESULTADOS	36
7.1. Evaluación de la actividad entomopatógena de las cepas de <i>Beauveria</i> <i>bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre <i>Triatoma dimidiata</i>	36
7.1.1. Pruebas de patogenicidad y selección de cepas de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> sobre ninfas del primer estadio (N1)	37
7.1.1.1. Mortalidad diaria	38
7.1.1.2. Virulencia y determinación del tiempo letal medio (TL ₅₀)	
7.1.2. Efecto entomopatógeno de las cepas seleccionadas sobre estados de desarrollo de <i>T. dimidiata</i>	42
7.1.2.1. Huevecillo	44
7.1.2.2. Estado ninfal y adulto	44

8. DISCUSIÓN	50
8.1. Primera fase: Selección de cepas	50
8.2. Segunda fase: Efecto de las cepas seleccionadas sobre los estados de desarrollo de <i>T. dimidiata</i>	52
9. CONCLUSIONES	60
10. RECOMENDACIONES	62
11. REFERENCIAS	63
12. ANEXOS	69

1. RESUMEN

La enfermedad de Chagas, considerada un serio problema en salud pública en Latinoamérica es transmitida en un 80% por las heces fecales de chinches hematófagas (Triatominae). En Guatemala los esfuerzos del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social –MSPAS-, han sido dirigidos prioritariamente al control vectorial de la enfermedad a través de la utilización de insecticidas piretroides. El vector *Triatoma dimidiata* es una especie nativa de la región que se encuentra distribuido en 21 de los 22 departamentos del país y ocupa diferentes ecotopos, lo que ha dificultado su control. Se presenta como una alternativa a los insecticidas químicos, el uso de agentes biológicos; siendo los hongos entomopatógenos considerados candidatos con buenas posibilidades para ser integrados con otros agentes debido a que son los microorganismos patógenos de insectos más frecuentemente encontrados en la naturaleza.

El propósito de este estudio fue evaluar tres cepas de *Beauveria bassiana* y cuatro cepas de *Metarhizium anisopliae* sobre *T. dimidiata*, principal vector de la enfermedad de Chagas en Guatemala, para determinar su patogenicidad y virulencia bajo condiciones de laboratorio. Se evaluaron las siete cepas a una concentración estándar (1×10^7 conidios/ml); se seleccionó una cepa de *Beauveria* y una cepa de *Metarhizium*, las que mostraron una mortalidad superior al 90% y el menor tiempo para matar al 50% de la población de ninfas de primer estadio expuestas. La segunda fase de los bioensayos se realizó con las cepas seleccionadas sobre los tres estados de desarrollo del vector, a las concentraciones 2×10^5 , 2×10^6 , 1×10^7 y 2×10^7 conidios/ml. Los datos obtenidos permitieron determinar la concentración letal media, la susceptibilidad de los estados de desarrollo del vector y la virulencia de las cepas seleccionadas de *Beauveria* y de *Metarhizium*.

Seis de las siete cepas produjeron una mortalidad confirmada sin diferencia significativa ($p=0.99$) en las ninfas del primer estadio, entre 93% y 100%; solamente una cepa no fue patogénica sobre *T. dimidiata*. Las cepas de *B. bassiana* y de *M. anisopliae* seleccionadas como las más virulentas presentaron un TL_{50} de 5.4 y 5.3 días, respectivamente. Los huevecillos fueron menos susceptibles a la cepa seleccionada de *Beauveria* con porcentajes altos de eclosión (80% y 68%) en las concentraciones evaluadas más bajas; además que las mismas no causaron muerte por micosis

secundaria (indirecta) a las ninfas emergidas; como fue el caso con *Metarhizium* en la concentración más baja. Los TL_{50} obtenidos en ninfas del primer y tercer estadios fueron significativamente menores ($p < 0.05$) para las ninfas del primer estadio; 10.5 y 7.7 días fue el tiempo requerido correspondientemente por *Beauveria* y *Metarhizium*, para matar al 50% de las ninfas de tercer estadio expuestas. A partir de los TL_{50} obtenidos en ninfas del primer y tercer estadio, se determinó que las ninfas del primer estadio fueron más susceptibles a los dos hongos entomopatógenos. Se determinó una relación dosis-mortalidad, debido a que la mortalidad aumentaba con la concentración. El cálculo de las concentraciones letales indicó que *Metarhizium* fue más eficaz sobre huevecillos, ninfas y adultos del triatomo.

2. INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es endémica de Latinoamérica y representa un problema grave en salud pública en la región. La OMS afirmó en 2002, que la pérdida económica para el continente por la enfermedad es de 8.156 millones de USD debido a la mortalidad prematura y morbilidad en población joven de años productivos; según el Informe sobre el Desarrollo Humano del PNUD. Se estima que hay 18 millones de personas infectadas con la enfermedad en países latinoamericanos (Villa *et al.* 2005). En 1981 fue estimado que 730,000 personas estaban infectadas en Guatemala, el grupo étnico más afectado diagnosticado, son hombres (25-39 años) en población económicamente activa (MSPAS/OPS 2005).

La enfermedad de Chagas es transmitida principalmente (80%) por insectos vectores conocidos popularmente en el país como chinches picudas, se encuentra clasificada dentro del grupo de enfermedades desatendidas u olvidadas. Sin embargo, su control ha llegado a ser una prioridad de la salud pública en muchos países latinoamericanos, gracias a la colaboración técnica y económica multisectorial. En la región, en 1998 fue creada la Iniciativa de los Países de Centroamérica de la enfermedad de Chagas (IPCA), con el fin de alcanzar la interrupción de la transmisión de la enfermedad para el año 2010.

Inicialmente en Guatemala el control de esta enfermedad infecciosa parasitaria fue enfocado en el control vectorial, siendo *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* los principales vectores en el país para ese entonces. Como resultado del rociamiento con insecticidas piretroides (2000-2004) y de la vigilancia entomológica, el nivel de infestación de estos triatominos se ha reducido en Guatemala. Se logró ser el primer país de Centro América en interrumpir la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas por *R. prolixus*. Ésta es una clara demostración del éxito de las estrategias del control vectorial para reducir o interrumpir la transmisión de la enfermedad, cuando la cobertura ha sido lo suficientemente alta. Se realizó un 100% de cobertura de las localidades infestadas con *R. prolixus*; éste no ha sido el caso para *T. dimidiata*. Esta última es una especie nativa de la región, que cuenta con una amplia distribución (21 de 22 departamentos) y ecotopos; lo que dificulta su control al propiciar potenciales reinfestaciones. Hasta ahora las estrategias utilizadas en el control de

triatominos en Guatemala se han basado únicamente en el empleo de insecticidas químicos, los cuales generalmente son eficaces en el corto plazo.

Los problemas que conlleva el uso de insecticidas químicos son numerosos y ampliamente documentados. La reinfestación es un fenómeno que se ha reportado para diferentes especies de triatominos, entre las cuales están *T. infestans* (Chile, Paraguay, Argentina y Brasil) y *T. dimidiata* (México, Honduras, Guatemala) (Oliveira 1997, Gürtler *et al.* 2004, Zerba 1999, Dumonteil *et al.* 2004, Nakawagua *et al.* 2003). La resistencia a los insecticidas se ha registrado tanto en el control de plagas agrícolas, como en el control de insectos vectores. El reporte histórico más relevante al respecto del control vectorial ha sido durante la campaña de erradicación del paludismo, debido al abuso de los insecticidas se desarrolló resistencia a los mismos, lo cual ha sido considerado concluyente en el fracaso de la estrategia. En relación a los vectores de la enfermedad de Chagas, existen algunos reportes de resistencia a los insecticidas, principalmente en países sudamericanos por especies de triatominos nativas de esa región.

La OMS declaró su posición sobre el manejo integrado de vectores en la cual promueve los principios de gestión establecidos en el marco mundial estratégico para el manejo de vectores de forma integral, entre los cuales comprenden la eficacia, acción intersectorial, medidas de reglamentación y sostenibilidad, entre otros (WHO 2008). Todos estos factores expuestos, además de la escasa selectividad de los productos químicos y el deterioro del medio ambiente producido por su uso; sugieren que es necesario buscar alternativas al control químico.

Por lo cual la utilización de enemigos naturales para el control de triatominos, constituye una apreciable alternativa, que puede ser eficiente en el mediano y hasta en el largo plazo tomando en cuenta las ventajas del control biológico. Sin embargo, existe poca información sobre el uso de alternativas amigables con el ambiente para el control de *T. dimidiata* en el país; por lo que el presente trabajo se realizó con el fin de contribuir a ampliar la información, esencialmente sobre el uso de agentes patógenos de estos insectos hematófagos. Por lo que se evaluó la patogenicidad y virulencia de diferentes cepas de hongos entomopatógenos aislados de otros insectos sobre *T. dimidiata*, para la selección de la cepa más promisoría.

3. ANTECEDENTES

3.1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas deriva su nombre del clínico brasileño, Dr. Carlos Justiano Ribeiro Das Chagas, quien fue el primero (1909) en describir la enfermedad. Demostró también el agente etiológico, dedujo la mayor parte del ciclo de transmisión de este parásito protozooario flagelado, *Trypanosoma cruzi*. Además de describir algunos de los vectores y huéspedes reservorios (Schofield 1994, Pinto 1984).

La enfermedad de Chagas también es llamada tripanosomiasis americana, por ser provocada por una parasitemia o parasitosis hística y hemática, además de ser endémica del continente Americano (Pinto 1984). Esta enfermedad infecciosa es un problema grave de la salud pública en Latinoamérica. La Organización Mundial de la Salud –OMS-, estima que hay 18 millones de personas infectadas con la enfermedad en países latinoamericanos (Villa *et al.* 2005). Esta enfermedad infecciosa parasitaria, es la cuarta causa de pérdida económica en Latinoamérica y según la OMS es la tercera enfermedad parasitaria en el mundo (Ramírez *et al.*, en Guhl & Jaramillo 2002).

Existen varias evidencias de que la enfermedad de Chagas y sus vectores eran conocidos por ciertas civilizaciones andinas precolombinas, pero se cree que la expansión principal de la enfermedad humana haya tenido lugar desde el siglo XVII con las migraciones de colonizadores europeos hacia las regiones interiores de Latinoamérica. El inicio de los ciclos de transmisión domésticos está probablemente relacionado con prácticas agrícolas que trastornaron los ciclos de transmisión selváticos (Schofield 1994). De manera general, se puede decir que el origen y la difusión de la enfermedad de Chagas humana se debe al contacto del hombre con los triatominos, en las regiones rurales de áreas endémicas principalmente (Pinto 1984).

Ordinariamente, *T. cruzi* se transmite al hombre en las deyecciones de sus vectores, las chinches triatominas, y no en la picadura de éstas. Las chinches contraen la infección alimentándose de un mamífero infectado pero después conservan la infección durante toda la vida. Los tripanosomas en las deyecciones pueden penetrar en las mucosas o cualquier herida o abrasión de la piel. (Schofield

1994). En el desarrollo de esta enfermedad intervienen el parásito como agente etiológico, un vector y el huésped.

3.2. Agente etiológico

T. cruzi es un protozoo flagelado parásito, que pertenece al phylum Sarcomastigophora, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae; que se desarrolla tanto en el vector como en el huésped (De León, 1997). Es un organismo pleomórfico que tiene dos fases en su ciclo vital, una fase en el hombre u hospederio reservorio y otra en los insectos transmisores (Cruz 1997).

El parásito experimenta varios cambios morfológicos durante su desarrollo, involucrando cambios en tamaño, forma y ubicación del cinetoplasto. El cinetoplasto es el organelo especializado que contiene el ADN citoplasmático del parásito, localizado en la mitocondria. Desde el punto de vista morfológico, esta especie vive en la sangre como tripomastigote flagelado típico (10 – 20 μm), representa un estadio infectivo no multiplicativo. En las células del sistema fagocítico mononuclear y otros tejidos del hombre y de varios animales, adopta la forma amastigote, que es redondeada u ovalada (2,5 -6,5 μm de diámetro) sin flagelo. Al alimentarse una chinche de un huésped infectado, los tripomastigotes se transforman en epimastigotes largos (6 – 15 μm) que se multiplican en el intestino medio de la chinche. Algunos epimastigotes pasan al recto de la chinche, donde se fijan a la pared rectal y se parten para formar tripomastigotes metacíclicos muy activos (largos de 17 – 22 μm), que representan la forma infectiva del parásito evacuado en las deyecciones de la chinche (Schofield 1994, De León 1997, Cruz 1997).

Este protozoo pertenece a una población heterogénea, compuesta por un pool de cepas que circula tanto en el ciclo doméstico como en el ciclo selvático, involucrando a humanos, insectos vectores y animales reservorios del parásito (Cruz 1997). Los índices de infección natural con *T. cruzi* varían en el país entre los diferentes ecotipos y la seroprevalencia en la población humana varia con las diferentes regiones geográficas o poblaciones del vector presentes (Monroy en OPS 2002a).

3.3. Vector

Los triatomínos son insectos hemípteros (chinchas) de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae; caracterizados en base a su hábito hematófago obligado. La subfamilia Triatominae contiene numerosas especies que actúan como vectores actuales o potenciales de la enfermedad de Chagas (Lent & Wygodzinsky 1979). Actualmente se reconocen 130 especies de triatomínos en base a sus características morfológicas, agrupadas en 17 géneros formando 5 tribus. Del total de especies conocidas más de la mitad se ha señalado infectadas natural o experimentalmente con *T. cruzi* (Dujardin *et al.* 2000, Carcavallo *et al.* 2000, Schofield 1994).

T. cruzi y sus vectores están distribuidos por todo el continente americano y algunas islas del Caribe. También se ha señalado la presencia de triatomínos en partes de África, Asia y Australia, aunque carecen de importancia epidemiológica y no se ha registrado la presencia del agente etiológico de la enfermedad de Chagas en el Viejo Mundo (Schofield 1994).

Los triatomínos son insectos bastante grandes con una forma corporal alargada y el abdomen ancho, característica parecida a la de muchos reduvidos depredadores. Su tamaño varía en adultos desde los 5 mm que mide *Alberprosema goyovargasi* de Venezuela, hasta 45 mm que pueden alcanzar los adultos de la especie mexicana *Dipetalogaster maxima* (Schofield 1994).

En general la hematofagia estricta es considerada como una característica diferenciable del resto de hemípteros inclusive dentro de la familia Reduviidae; sin embargo, existen otros tres grupos de hemípteros (Cimicidae, Polictenidae y Cleradini) que presentan también hematófagos obligados. No obstante, sólo los triatomínos tienen la probóscide corta (no alcanza el primer par de coxas), delgada y recta, especializada para perforar la piel de vertebrados. En el momento de picar el rostro o pico, se dobla especialmente a la altura de la articulación de los segmentos 2º y 3º, gracias a una porción o conexión membranosa (Schofield 1994, Zeledón 1981).

Varias especies de Triatominae han colonizado habitaciones humanas, donde transmiten la enfermedad al hombre y a sus animales domésticos. Las especies más importantes epidemiológicamente y que ocupan el área más amplia, son *Triatoma infestans*, *T. dimidiata* y *Rhodnius prolixus* (Lent & Wygodzinsky 1979).

En Centroamérica, *R. prolixus*, *T. dimidiata* y *R. pallecens* son los principales vectores de la enfermedad de Chagas. *R. prolixus* se encuentra solamente en ambientes domiciliarios, mientras *T. dimidiata* y *R. pallecens* se encuentran tanto en el peridomicilio como en ambientes silvestres. En 1991 la Organización Mundial de la Salud reconoció las seis más importantes especies relacionadas con la transmisión de la enfermedad de Chagas en América Latina. Dos de éstas se encuentran reportadas para Guatemala, *R. prolixus* y *T. dimidiata* con índices de infección de 20.6% y 19.1% respectivamente evidenciándose la importancia epidemiológica que tienen estas dos especies (Monroy 2003).

Tabla 1. Estimación de las tasas de transmisión de *Trypanosoma cruzi* al hombre

Transmisión por vectores	*
	>80%
Transmisión por transfusión de sangre	16%
Transmisión congénita	2%
Otras vías (oral, trasplante de órganos, accidente de laboratorio)	< 1%

*expresadas en porcentajes de la incidencia total.

(Schofield 1994).

3.3.1. *Triatoma dimidiata* (Latrielle)

3.3.1.1. Clasificación taxonómica y distribución geográfica

T. dimidiata pertenece a la tribu Triatomini, subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Las especies que tienen numerosas similitudes morfológicas constituyen los complejos específicos. Este es el caso de *T. dimidiata* debido a que presenta una alta variabilidad tanto en aspectos cromáticos de su morfología, tamaño y comportamiento. Se le ha dado el tratamiento de “complejo dimidiata”,

porque algunos estudios parecen indicar fuertes divergencias entre algunas poblaciones (Carcavallo *et al.* 2000, Guhl & Schofield 2000).

Se encuentra ampliamente distribuida en el continente desde el Centro de México, todos los países de Centroamérica hasta parte de Colombia, Venezuela, Guayana, Ecuador y Norte de Perú. La altitud varía desde el nivel del mar a 2,700 m.s.n.m. (Zeledón 1981; Carcavallo *et al.* 2000). En Guatemala prefiere altitudes de los 800 a los 1000 metros y muy raramente se encuentra arriba de los 1,600 m.s.n.m. (Monroy en OPS, 2002a) y es considerado como el vector más importante dado su amplia distribución geográfica, encontrándose en 21 de los 22 departamentos del país (OPS, 2002a). Jutiapa, Santa Rosa, Chiquimula, Alta Verapaz y El Quiché fueron los departamentos reportados con mayor índice de infestación y localidades positivas con *T. dimidiata* por Tabaru y colaboradores (1999). Epidemiológicamente *R. prolixus* ha sido considerada de mayor importancia; no obstante, debido al hábito que presenta en el área centroamericana, el proceso de eliminación de este vector ha logrado avances significativos por las intervenciones del personal técnico de Enfermedades Transmitidas por Vectores en el país.

3.3.1.2. Descripción

El tamaño de los adultos varía, el macho mide 24,5 -32,0 mm y la hembra de 24,5 – 35,0 mm. El color general es oscuro de alquitrán o negro con el conectivo y el corio que varía de una amarillo pálido al anaranjado, con una pilosidad corta e inconspicua. La cabeza es rugosa dorsalmente, cerca de dos veces más larga que el ancho a la altura de los ojos. Los ojos vistos lateralmente alcanzan el borde de abajo, pero no el de arriba. El pronoto es uniformemente oscuro o negro; el lóbulo anterior posee un tubérculo discal y uno lateral más pequeño. El escutelo es rugoso, con el área central no deprimida; el proceso apical es tan largo como el cuerpo del escutelo, subcilíndrico y ligeramente doblado hacia abajo en el ápice. Los hemélitros alcanzan el ápice del abdomen, dejan los segmentos genitales de la hembra descubiertos y en algunos casos sobrepasan el ápice del abdomen del macho (Zeledón 1981).

3.3.1.3. Biología

La información ecológica para *T. dimidiata* muestra una gran adaptabilidad a numerosos hábitats y fuentes de alimentación (Carcavallo *et al.* 2000), lo que dificulta su control. Es una especie oportunista que no tiene una antropofilia marcada y es frecuente encontrar que sus fuentes alimenticias son muy variadas (polifilia). Es frecuente encontrar al vector en casas de piso de tierra, paredes de bajareque y adobe; pero también se le puede encontrar en casas bien construidas, con paredes repelladas y piso de cemento. Se ha reportado que reaparecen rápidamente después de un rociamiento con insecticidas. En Guatemala generalmente las densidades poblacionales son bajas pero aún así es capaz de transmitir la enfermedad de Chagas (Monroy en OPS 2002a).

2.3.1.4. Huésped

Todas las especies de triatomíneos requieren sangre de vertebrados para su desarrollo completo (hematofagia obligada). La mayoría de las especies se alimentan sobre mamíferos terrestres o arbóreos, especialmente didélfidos, edentados y roedores; otras se encuentran asociadas con murciélagos, y algunos con aves (Lent & Wygodzinsky, 1979). A diferencia de otros tripanosomas que afectan al hombre (ej. *Trypanosoma rangeli*), *T. cruzi* no produce patología alguna en el triatomíneo por lo que se puede considerar a este un vector biológico y no un reservorio (Pinto 1984).

En condiciones naturales los triatomíneos están asociados a diferentes vertebrados. Algunos triatomíneos exhiben una marcada preferencia por determinado huésped (estenofagia); no obstante otras especies son oportunistas, con una valencia ecológica amplia en cuanto a su capacidad de elegir hospedero (eurifagia), tales como *T. dimidiata*, que se alimenta de aves, varios mamíferos, reptiles y anfibios (Zeledón 1983).

La infección por *T. cruzi* en hospederos vertebrados se ha registrado en más de 150 especies de 24 familias de mamíferos que incluyen reservorios silvestres (armadillos, zarigüeyas, murciélagos, osos hormigueros, roedores, etc), domésticos (perros, gatos, etc.) y el hombre (De León 1997). Se constituyen en reservorios sólo los mamíferos, especialmente los de pequeño y mediano tamaño. Los mamíferos de gran porte como bovinos y equinos no son considerados clásicamente reservorios

del tripanosoma, al ser inoculados experimentalmente de inmediato eliminan la infección. Cerdos, ovinos y caprinos pueden presentar parasitemia transitoria en la infección experimental. Mientras las aves, anfibios y reptiles participan en la ecología de la enfermedad de Chagas por ser fuente alimenticia para los triatominos; pero no son hospederos del tripanosoma, son considerados refractarios (Pinto 1984, De León 1997).

Se ha manejado que el origen y la difusión de la enfermedad de Chagas humana se deben al contacto del hombre con los triatominos. La participación del hombre en la cadena epidemiológica se inicia cuando éste invade o modifica el ambiente silvestre (Pinto 1984).

3.4. Métodos de Control de Triatominos

En salud pública raras veces resulta factible tratar la enfermedad de Chagas, por lo que su control se basa principalmente en la interrupción de la transmisión mediante la eliminación de las poblaciones de vectores domésticos y la disminución del riesgo de transmisión por transfusión de sangre de donantes infectados (Schofield 1994).

Los métodos potenciales de intervención para controlar las poblaciones de triatominos en su mayoría han sido realizados a nivel de investigación, y algunos ensayos en campo. Estos métodos de control incluyen insecticidas, modificación de viviendas, hormonas, reguladores del crecimiento, trampas, repelentes, quimioesterilizadores, manipulación genética y varios agentes de control biológico incluyendo parasitoides y entomopatógenos (nemátodos y hongos) (Schofield 1994). Debido al comportamiento poblacional de las chinches, la mayoría de estos métodos han sido rechazados, con excepción de ciertos insecticidas (piretroides) y técnicas de mejoramiento de vivienda que pueden ser utilizados simultáneamente tomando en cuenta que sus parámetros operacionales difieren (Schofield 1994).

En términos operacionales de control para *T. dimidiata*, parece haber tres diferentes escenarios:

- Presencia de poblaciones domésticas y peri domésticas, sin poblaciones silvestres (Ecuador, norte de Perú y posiblemente algunas partes de Colombia).

- La presencia de poblaciones domésticas y peri domésticas en contacto con las poblaciones silvestres (sur de México, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá y posiblemente algunas partes de Colombia).
- Poblaciones silvestres sin evidencia de poblaciones domésticas o peri domésticas (Belice y la mayor parte de la península de Yucatán).

En Centroamérica y el sur de México, donde las poblaciones domésticas son potencialmente reforzadas por focos silvestres locales, una estrategia de erradicación sería probablemente inefectiva. Schofield sugiere que es necesario diseñar un enfoque operacional que pueda ser sostenido por un largo tiempo (OPS 2002a).

Para lograr la ausencia del vector dentro de la vivienda los participantes en el Taller para el Establecimiento de Pautas Técnicas en el Control de *Triatoma dimidiata*, en El Salvador (2002) concluyeron que las estrategias integrales y las intervenciones deben diseñarse de acuerdo a cada situación particular. Con el fin de lograr la máxima eficacia de los métodos de control, se deben tener en cuenta también los factores socioeconómicos y culturales de los pobladores. En salud como en agricultura, se utilizan diferentes métodos de control, los cuales se clasifican en:

3.4.1. Control Químico

Este se realiza con agentes químicos como: atrayentes, reguladores del crecimiento, repelentes, quimioesterilizadores y principalmente con insecticidas (Schofield 1994). Los insecticidas se clasifican por: a) composición química, b) fase del insecto susceptible, c) duración del efecto y, d) acción. Los insecticidas tienen la ventaja de obtener resultados inmediatos, sin embargo, presentan ciertas desventajas, tales como: afectan insectos benéficos, destruyen enemigos naturales del vector, tóxicos a mamíferos, algunos dejan residuos que se han encontrado en la cadena alimenticia, pueden causar resistencia y existe tendencia a no producir a gran escala insecticidas nuevos (Secretaría de Salud 1996).

Compuestos pertenecientes a casi todas las clases de insecticidas se han ensayado contra los triatomíneos; contándose ahora con los piretroides modernos, que han demostrado ser muy efectivos para el control de los triatomíneos (Schofield, 1994). Sin embargo, a pesar que Guatemala (1932) fue el tercer país centroamericano en donde se reportó la enfermedad de Chagas; no fue sino hasta la década de los 90 que las universidades de San Carlos de Guatemala y del Valle iniciaron con ensayos de campo en control vectorial químico. Posteriormente, en el 2000 el gobierno guatemalteco con el apoyo del gobierno del Japón implementó el Proyecto para el Control Vectorial de la Enfermedad de Chagas, gracias a la iniciativa de la Organización Panamericana de la Salud – OPS- y a la contribución de las dos universidades (USAC y UVG).

Se priorizaron en dos fases los 10 departamentos a intervenir, según criterios epidemiológicos, serológicos y entomológicos. Las intervenciones de control antivectorial con rociamiento de insecticidas se han seguido realizando conforme lo programado, contando con el apoyo técnico y financiero de la Agencia Japonesa de Cooperación Internacional – JICA- (OPS 2002b).

En Sur América, entre las investigaciones realizadas para monitorear la efectividad residual de los insecticidas después de una o dos aplicaciones, se ha observado el fenómeno de reinfestación con *T. infestans*. En ocasiones casi hasta alcanzar el índice de infestación pre-rociamiento tanto en el peridomicilio como en el intradomicilio, generalmente proporcional al tiempo después de la aplicación con insecticidas (Cecere *et al.* 2002, Gürtler *et al.* 1994, Gürtler *et al.* 1999). En Guatemala en el departamento de Chiquimula (Cordón-Rosales en OPS 2002a) se ha observado una tendencia similar en relación a reinfestación con *T. dimidiata*; mientras que Nakagawa y colaboradores (2003a y 2003b) reportaron en Zacapa y Jutiapa una reducción significativa del índice de infestación, sin embargo, para *R. prolixus* se observa una disminución total (0%) en el índice de infestación post-rociamiento. En Jutiapa se reportó que llega a darse inclusive una colonización observándose en algunas localidades una colonización del 100% después de la intervención con piretroides (Nakagawa *et al.* 2003b).

3.4.2. Control Físico

Consiste básicamente en introducir cambios en el ambiente para disminuir o evitar el contacto vector-hombre; aquí se incluyen las barreras físicas (establecimiento de refugios fuera del perímetro domiciliar, reestablecimiento de ecotopos naturales). Este tipo de control es duradero, con bajo costo de mantenimiento; sin embargo, los resultados son lentos y el gasto inicial generalmente es grande sin obtenerse un control total (Secretaría de Salud 1996).

En vista de que *T. dimidiata* está ampliamente representada en el ámbito silvestre y continúa invadiendo frecuentemente los ecotopos artificiales, su control debería centrarse en la premisa de “aprender a vivir con el insecto” sin que éste nos haga daño. Por lo que se ha propuesto que el control debería basarse principalmente en métodos físicos y ecológicos (Zeledón en OPS 2002a).

3.4.3. Control Cultural

Está íntimamente ligado al físico, siendo en algunas ocasiones difícil de diferenciar entre ellos. Por medio de educación sanitaria se persigue obtener cambios en las costumbres de las personas pudiéndose lograr la participación de la comunidad, orientación en los modos de cultivo, mejorar la vivienda y/o evitar el grado de exposición (Secretaría de Salud 1996).

Desde 1929 en Latinoamérica se han llevado a cabo ensayos sobre mejoras en viviendas rurales para eliminar el nicho doméstico, dificultando la colonización por los triatominos (Schofield 1994) obteniéndose resultados promisorios y algunos no tanto. En 1993 Monroy y colaboradores realizaron un estudio piloto en el país obteniendo un año después del mejoramiento de las viviendas, un 92% de reducción de la población total del vector (Monroy *et al.* 1998). En Argentina Ceere y colaboradores (2002) reportaron que la combinación de rociamiento con insecticida y mejoramiento parcial de las paredes controló la infestación doméstica de *T. infestans*, pero no eliminó al vector del área de estudio ni incrementó la efectividad del control químico.

El mejoramiento de viviendas ha sido en general, situaciones aisladas por ser parte de investigaciones o de programas de organizaciones no gubernamentales y/o agencias internacionales. Usualmente cuando llega a ser programa el mejoramiento de la vivienda afronta

diversas restricciones que limitan su aplicabilidad más generalizada. Entre los factores limitantes que presenta están: dificultades técnicas, económicas, es un proceso lento y a menudo se realiza en pequeñas áreas limitadas, lo que deja muchos focos desde los cuales las chinches podrían reinvasar (Schofield 1994).

En relación a la educación sanitaria sola como tal no puede alcanzar el efecto deseado sobre la transmisión de la enfermedad de Chagas, pero se reconoce como componente imprescindible de otras intervenciones (Schofield 1994). En nuestro país a pesar que la participación comunitaria es incipiente con respecto al control de la enfermedad de Chagas, se han obtenido muy buenos resultados con reportes de nuevas localidades infestadas, algunas reinfestaciones y otros; debido a su alta sensibilidad. No obstante, debe haber una respuesta por parte del personal de salud como estímulo a la participación de las comunidades.

3.4.4. Control Legal

Se basa en las leyes sanitarias y la formulación de leyes que apoyen a los programas (Secretaría de Salud 1996).

Durante la XIII Reunión de Sector Salud de Centroamérica (RESCA) realizada en 1997 los países del área establecieron la Resolución No. 13 que el **“Control de la Enfermedad de Chagas es una actividad prioritaria en los países de Centroamérica”** (OPS 2002b). Para el cumplimiento de esta resolución, los países acordaron la implementación de un Programa Multinacional para lograr la interrupción de la transmisión vectorial y la eliminación de la transmisión transfusional. Este programa se conoce como la Iniciativa de los países de Centroamérica -IPCA-; creándose simultáneamente una Comisión Técnica Intergubernamental, para el seguimiento y evaluación de las actividades.

3.4.5. Control Biológico

Este tipo de control se entiende como la regulación de plagas realizada por la acción de sus enemigos naturales (depredadores, parasitoides y patógenos); a través del estudio y utilización de los mismos. El control biológico se manifiesta en forma natural por el aumento y/o conservación de los enemigos naturales, o por la acción del hombre a través de la introducción de éstos (DeBach 1964).

Uno de los atractivos de los agentes de control es su especificidad, la cual permite la sobrevivencia de los otros organismos a los cuales no está dirigido, pero paradójicamente la especificidad disminuye las posibilidades de comercialización. Idealmente los objetivos del control biológico no son la erradicación. Es más bien, mantener las poblaciones a densidades bajas que permitan la coexistencia con los enemigos naturales (Secretaría de Salud 1996).

Según Schofield (1994) el uso de agentes de control biológico debido principalmente al comportamiento poblacional de las chinches, ha sido rechazado. No obstante, el control biológico debe ser considerado una buena alternativa principalmente en las localidades donde el control químico ha sido el habitual sin obtener los resultados deseados.

En Guatemala se han logrado avances significativos con relación al control biológico en la agricultura, no solo en investigación sino también en producción comercial. Sin embargo, en lo que respecta a control de vectores la utilización de agentes biológicos ha sido principalmente utilizado en mosquitos. Existen muy pocos trabajos ensayados sobre triatominos; Enríquez (2000) obtuvo resultados satisfactorios con el parasitoide *Telenomus fariai rabinovichi*. Este parasitoide afecta los huevecillos de *T. dimidiata*, tendiendo a parasitar huevecillos de forma inversa a la edad de los mismos. Esta investigación es considerada pionera en la búsqueda de métodos alternativos al control químico, el cual ha sido el único método utilizado por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social en el país. Investigadores de la Universidad del Valle de Guatemala realizaron ensayos en manipulación genética de la microbiota de *Rhodnius prolixus* para interrumpir el ciclo biológico del *T. cruzi* a través de este vector. Sin embargo, esto representa dificultades técnicas y éticas para ensayar en campo.

3.4.6. Control Integral

Se considera que cada uno de los métodos de control por separado no podrá lograr los objetivos esperados; el control sólo es posible alcanzarlo combinándolo adecuadamente para cada situación en particular, lo cual nos lleva al control integrado (Secretaría de Salud 1996). En 2007 en el marco mundial estratégico para el manejo de vectores la OMS declaró su posición en la cual promueve los principios de gestión establecidos de forma integral, entre los cuales están: eficacia, acción intersectorial, medidas de reglamentación y sostenibilidad, entre otros. Así mismo, se ha reconocido la creciente necesidad del manejo integrado de vectores (MIV), debido a que proporciona los medios para reducir la dependencia a los insecticidas para el control de vectores (OMS 2007).

Cecere y colaboradores (2002) reportaron que la combinación insecticidas y mejoramiento parcial de las paredes controló la infestación domiciliar de *T. infestans* (en Argentina), sin la eliminación del vector del área de estudio ni favoreció el aumento de la efectividad del control químico. Esto confirma que en cada situación particular, se deben tomar en cuenta tanto los factores bióticos como los abióticos que inciden en la población a controlar, previo a utilizar o combinar los métodos de control.

3.5. Hongos Entomopatógenos

Los primeros microorganismos que se encontraron produciendo patología a los insectos, fueron los hongos por su crecimiento macroscópico sobre la superficie de su hospedero. Sin embargo, algunos hongos entomopatógenos no producen crecimiento superficial o producen muy poco. Las enfermedades causadas por estos hongos son denominadas “micosis” (Aleán 2003).

Los agentes microbiológicos, en particular los hongos entomopatógenos, ofrecen varias ventajas en el control de plagas: son los microorganismos parásitos de insectos más frecuentemente encontrados en la naturaleza, pueden ser integrados con otros agentes de biocontrol (Luna & Lecuona 2000), son más selectivos que los productos químicos, forma de infección (por medio de la cutícula), bajo costo de producción, bajo impacto ambiental, sostenibilidad, fácil reproducción (en medios artificiales), alto poder residual y patogénico, no tienen efectos secundarios sobre

organismos acuáticos y animales de sangre caliente, en general se ha comprobado mediante pruebas de seguridad que los hongos hyphomycetes registrados (*Beauveria*, *Metarhizium* y otros) no presentan riesgos tangibles a vertebrados (infecciones, toxicidad, alergias y mutaciones) (Barrientos 2002, Romaña & Fargues 1992).

Algunas de las desventajas que han limitado el desarrollo del uso de hongos patógenos de insectos en años pasados son:

- Factores ambientales: sensibilidad a temperaturas extremas, desecación y luz ultravioleta. Estas limitantes están siendo contrarrestadas mediante el uso de aditivos (protectores solares, aceites, antidesecantes).
- Almacenamiento: requieren condiciones de almacenamiento más exigentes que las moléculas inorgánicas. En años recientes se ha reportado períodos de almacenamiento de siete años, conservando su viabilidad y capacidad infectiva.
- Velocidad de acción: en general, los biopesticidas no matan instantáneamente. Alcanzan buenos niveles de control entre una y tres semanas después de la aplicación, dependiendo del insecto blanco (plaga) y del ambiente (Devotto & France 2000, Lord 2001).

En relación al control de triatominos con especies de hongos entomopatógenos, se han realizado estudios, principalmente en condiciones de laboratorio, para utilizarlos como biorreguladores (Romaña & Fargues 1992, Luz & Fargues 1998, Luz *et al.* 1998, Lecuona *et al.* 2001). En Guatemala Benítez (2008) realizó bioensayos con formulaciones de aceite vegetal de la cepa AES.Met.MB, *Metarhizium anisopliae*, sobre *T. dimidiata* sin éxito. En lo que respecta a investigaciones bajo condiciones de campo muy pocos estudios han sido reportados. *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill, fue probada para el control de *T. infestans* (Klug) usando una aplicación indirecta por contacto (Luz *et al.* 1999) con resultados promisorios.

3.5.1. Clase Hyphomycetes (Deuteromycotina)

Los hongos que comúnmente se encuentran parasitando o causando patologías en insectos pertenecen a tres subdivisiones de la división Eumycotina. La mayoría son encontrados en la subdivisión Deuteromycotina, otros en Mastigomycotina y Ascomycotina. Algunos pocos miembros de Basidiomycotina que forman asociaciones parasíticas con insectos son raramente encontrados (Poinar & Thomas 1984).

Los Deuteromycotina son llamados también hongos imperfectos porque la mayoría de éstos carecen o se desconoce su fase sexual, su reproducción asexual es por medio de conidias. La clasificación e identificación están basadas por el conidio, aunque el estado perfecto a menudo se conoce y algunas veces está presente. El micelio (si presenta) típicamente septado con septos frecuentes; conidios normalmente presentes excepto en unos pocos géneros. Los Deuteromycotina entomopatógenos son encontrados en dos clases, Hyphomycetes y Coleomycetes. (Aleán 2003, Barnett & Hunter 1998).

El grupo de hongos considerados con mayor potencialidad y estudiados son los Hyphomycetes, que causan enfermedades conocidas como “muscardinas” este término también puede referirse a los hongos en sí. La palabra se aplicó por primera vez a la enfermedad del gusano de seda (muscardina blanca), causada por *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. También ha sido usada para referirse a otras micosis provocadas por hongos imperfectos (DeBach 1964).

3.5.2. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos

De manera general, los microorganismos parásitos pueden ser divididos en dos grupos de acuerdo con el método natural de entrada dentro de sus huéspedes susceptibles. El primer grupo que tiene una acción del tipo de contacto infectando normalmente al huésped a través del integumento, incluye los hongos entomopatógenos así como, ciertos nemátodos entomófilos. El segundo grupo contiene organismos que deben ser ingeridos para que causen la infección (DeBach 1964).

La duración de las diferentes fases del ciclo del hongo depende de la especie blanco y las condiciones ambientales presentes durante la infección.

3.5.2.1. Adhesión al tegumento

El primer tejido del hospedero con el cual la mayoría de los micopatógenos se pone en contacto, es la cutícula, éste tiene una doble función; por un lado es el sustrato en el cual los conidios se fijan, y por el otro, proporciona las señales químicas necesarias para la orientación y formación del tubo germinativo que va a penetrar. La adsorción de los conidios a la cutícula, es un proceso inespecífico, mediado por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. Las características físicas y químicas de las superficies de la cutícula del insecto y el conidio son las responsables de esta unión (Rosas 2002, Aléan 2003).

La secreción de un mucílago adhesivo mientras el conidio se hincha durante el desarrollo de la pregerminación complementa las interacciones hidrofóbicas iniciales entre el conidio y la epicutícula. Los tubos germinativos de *Metarhizium anisopliae* desarrollan apresorios (superficie cuticular), clavijas infectivas (epicutícula), hifas penetrantes y platos penetrantes (procutícula), cuerpos de hifas tipo levaduras (blastoporos) para dispersión en el hemocele. Estas transiciones morfológicas sugieren que las células germinales (germlings) están constantemente sintiendo su ambiente y ajustándose en orden para colonizar el tejido del insecto y contrarrestando las potentes repuestas del hospedero. (Hajek & Leger, 1994). Por otro lado, el desarrollo de los tubos germinativos y estructuras del tipo apresorio, producidas por los micopatógenos de artrópodos terrestres, se cree que se unen al hospedero específico, influenciados por la superficie epicuticular (Rosas 2002).

3.5.2.2. Germinación del conidio

Este proceso es por medio del cual una espora emite uno o varios pequeños tubos germinales, los cuales por crecimiento y alargamiento dan origen a las hifas. Depende de la humedad ambiental y de la temperatura; y en menor grado de las condiciones de luz y nutricionales (Aleán 2003).

Rosas (2002) señala que son requeridas fuentes de carbono, nitrógeno y energía para la formación del tubo germinativo. La habilidad del hongo para utilizar estos elementos, está en función de su agresividad y virulencia, expresada en la cantidad de esporas o conidios (requeridas para matarlo), tiempo de germinación y penetración después de su adhesión a la cutícula del hospedero. Para que la germinación sea exitosa además de la asimilación de los nutrientes utilizables, se requiere de la tolerancia a algunos componentes tóxicos presentes.

En los hongos entomopatógenos, para que ocurra la germinación de los conidios e invasión del cuerpo del hospedero, las esporas deben permanecer en contacto con la superficie del tegumento del insecto y responder a señales bioquímicas, generadas por condiciones físicas y fisiológicas del hospedero y a las generadas por el conidio mismo (Rosas 2002).

Además han surgido explicaciones alternativas que pueden ser más bien aditivas, en relación al efecto de la ruptura epicuticular y la patogénesis de los hongos. Se ha demostrado que ocurren deshidrataciones crónicas en el insecto, si la cutícula es rasgada. Esto favorece a los hongos de varias maneras: por debilitamiento del insecto, incrementando la humedad alrededor de la espora, favoreciendo la penetración de la hifa o liberando agua con nutrientes solubles (Rosas 2002).

3.5.2.3. Penetración por la cutícula

La topografía y propiedades químicas en general de la epicutícula, pueden incrementar la adhesión de los conidios y subsecuentemente la orientación del tubo germinativo. El modo de penetración y grado de resistencia principalmente dependen de las propiedades de la cutícula, grosor, esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales. Los sitios de penetración de los hongos entomopatógenos son por lo general, la membrana y uniones articulares, así como la región intersegmental. En Insectos con segmentos fuertemente esclerosados generalmente son invadidos vía membranas artrodiales o por los espiráculos. (Rosas 2002, Hajek & St. Leger 1994, Aleán 2003).

La penetración de la cutícula por conidias germinadas, generalmente se ha considerado que involucra componentes enzimáticos y mecánicos de la siguiente manera: degradación enzimática cuticular y la presión mecánica por el tubo germinal. En la zona de penetración actúan principalmente las proteasas, lipasas y quitinasas siguiendo una secuencia lipasa-proteasa-quitinasa; facilitando la penetración física. La fuerza mecánica es notable en el extremo de una hifa invasiva donde la capa cuticular es deformada por presión. La producción de quitinasa ocurre después del proceso de infección y una vez que el hongo atraviesa la cutícula debe vencer el sistema inmunológico del hospedero antes de entrar a la hemolinfa y desarrollarse dentro del insecto (Rosas 2002, Aleán 2003).

Además de la penetración del integumento numerosos investigadores han documentado infecciones a través de cuerpos abiertos, entre los cuales están la cavidad bucal, espiráculos, tráqueas y región anal (Aleán 2003).

3.5.2.4. Replicación en el hemocele

Después de llegar al hemocele, la mayoría de los hongos convierten el crecimiento micelial en una fase de levadura o sea crecimiento por gemación. Se producen toxinas y enzimas, aunque algunos hongos aparentemente no poseen toxinas, matan al insecto al consumir todos los nutrientes o por física destrucción (Aleán 2003).

Los hongos pueden evitar la defensa inmune de un insecto por a) desarrollo de protoplastos que no son reconocidos por la población de hemocitos del insecto, b) formando cuerpos hifales multiplicándose y dispersándose rápidamente y c) produciendo micotoxinas (Aleán 2003).

3.5.2.5. Producción de toxinas

Posterior al crecimiento del hongo en el hemocele, la micosis induce a síntomas fisiológicos anormales en el insecto tales como convulsiones, carencia de coordinación y comportamientos alterados. (Aleán 2003). Después de un desarrollo limitado del hongo sobre el integumento o tracto digestivo, induciendo toxemias, los hongos entomopatógenos matan a su hospedero (Rosas 2002).

Un aspecto principal del potencial patogénico es la toxigenicidad, es decir, la capacidad de un agente patógeno para producir toxinas, sustancias químicas que lesionan al huésped y le provocan una enfermedad (Prescott *et al.* 1999).

Muchos hongos patógenos de insectos producen toxinas, aunque algunas toxinas han sido completamente descritas químicamente, la rareza de estudios toxicológicos dejan su papel en la patogénesis no claro. Como una excepción, las destruxinas depsipeptidas cíclicas son producidas por aislamientos de *M. anisopliae* en cantidades que correlacionan la toxicosis con el diferencial de virulencia de los aislamientos. Las destruxinas afectan varios organelos blanco (mitocondria, retículo endoplasmático y membrana nuclear), paralizando las células y causando disfunción del intestino medio, túbulos de Malpigi, hemocitos y tejido muscular (Hajek & St. Leger 1994).

Las destruxinas tienen como estructura básica cinco ácidos y un ω -hidroxiácido. Aproximadamente 28 diferentes destruxinas, estructuralmente relacionadas, han sido identificadas de diferentes hongos. Se conoce que estas toxinas, bloquean las reacciones de defensa de bloques multicelulares, perturban la síntesis macromolecular (proteínas, nucleótidos, ADN y ARN), interfieren con la actividad de algunas enzimas, tienen propiedades antivirales y además inhiben la respuesta celular inmune, que es probablemente una de las principales actividades de estos péptidos tóxicos (Rosas 2002, Hajek & St. Leger 1994). No obstante es de considerar que los insectos varían en su susceptibilidad a las destruxinas y difieren también los síntomas de toxicosis entre las especies de insectos (Rosas 2002).

3.5.2.6. Muerte del hospedero

En general las toxinas causan la muerte del insecto debido a la degeneración de los tejidos, producto de la pérdida de la integridad estructural de las membranas seguido de la deshidratación de las células por pérdida de fluido. Sin embargo, algunos hongos parecen no producir toxemias, matan al insecto al consumir todos los nutrientes o ya sea, por destrucción física (Aleán 2003).

3.5.2.7. Emergencia del micelio y esporulación

Después de muerto el insecto, si la disponibilidad de agua es alta los hongos emergen al exterior a través de la cutícula y esporulan sobre el cadáver produciendo inóculo para infectar a otros insectos, Si las condiciones no son favorables, queda dentro del cadáver del insecto, donde puede sobrevivir por algunos meses y eventualmente producirá esporas cuando lleguen las condiciones favorables. La esporulación ocurre generalmente en cadáveres pero puede también ocurrir en insectos vivos (Aleán 2003).

Los procesos de producción, descarga, dispersión, sobrevivencia y germinación de las esporas frecuentemente dependen de las condiciones ambientales. La dispersión de la espora puede ser un proceso activo o pasivo, según las características de la espora y el esporangio. Cada conidia puede adherirse o pasar de un invertebrado a otro por dispersión. Esporas de hongos patógenos de insectos son ocasionalmente muy abundantes en muestras de aire, sugiriendo que la dispersión aérea no es poco común (Hajek & St. Leger 1994, Aleán 2003).

3.6. Características de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin

El género *Beauveria* (Moniliales) está compuesto por varias especies: *B. bassiana*, *B. brongniartii* o *B. tenella*, *B. amorpha*, *B. velata*, sin embargo, las más frecuentemente estudiadas son *B. bassiana* (Bals.) Vuill. y *B. brongniartii* (De Lacroix) Siemaszko (Aleán 2003). *B. bassiana* fue uno de los primeros hongos entomopatógenos en ser descritos, desde 1835 se le conoce como el agente causal de la “muscardina blanca”.

El micelio de *Beauveria* es blanco o está suavemente coloreado con tonos blanquecinos con una algodonosa o polvorienta apariencia, en algunas especies los conidióforos hinchados en la base y adelgazándose hacia la porción que sostiene el conidio, la cual se presenta en forma de zig-zag (Barnett & Hunter 1998). Los conidios de *B. bassiana* son secos, hialinos, de forma globosa a subglobosa u oval. Los conidióforos pueden ser solos o agrupados en masas irregulares con un raquis alargado que dan origen a manojos de conidios. La temperatura óptima para su desarrollo es de 23-25°C (Rosas 2002).

3.7. Características de *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin

Tiene una posición taxonómica cercana a *Penicillium* en la familia Moniliaceae. Las infecciones con *M. anisopliae*, la causa de la muscardina verde, son similares en muchos aspectos a las causadas por *B. bassiana*, parasita alrededor de 200 especies de insectos. (DeBach 1964, Rosas 2002).

El género *Metarhizium* se caracteriza por tener conidios secos, catenulados, acomodados densamente. La colonia de *M. anisopliae* aparece blanca cuando joven, pero cuando los conidios maduran, el color se torna a verde oscuro. Los conidióforos son ramificados y el conidio inicial es producido por simple obstrucción en el extremo distal del conidióforo. Una cadena de conidios es formada en cada conidióforo, estando el conidio más joven adyacente al conidióforo. La temperatura óptima de crecimiento es de 27 a 28 °C (Rosas 2002).

4. JUSTIFICACIÓN

Se deben buscar diferentes medidas de control vectorial, debido a que la transmisión por vectores representa más del 80% de la transmisión total de *Trypanosoma cruzi*; por ello las medidas más importantes de control de la enfermedad de Chagas actualmente están dirigidas contra los vectores triatominos. Se ha visto cómo tras una lucha exitosa contra estos hemípteros, se logra que disminuyan también los índices de transmisión por transfusión sanguínea y por vía transplacentaria (Guhl & Schofield 2000).

El uso de insecticidas es el tipo de control más utilizado; sin embargo, a pesar del rociamiento con piretroides de las casas infestadas, se han reportado casos en los cuales se observan infestaciones reanudadas por *Triatoma dimidiata*. Esto fue comprobado en nuestro país, en los departamentos de Jutiapa (Nakagawa *et al.* 2003b), Zacapa (Nakagawa *et al.* 2003a), Chiquimula (OPS 2002a) y Santa Rosa (Melgar *et al.* 2004). Las causas por las cuales se puede dar una reinfestación son varias; sin embargo, las más aceptadas son: las casas tienen características estructurales que permiten a las chinches sobrevivir al rociado, la existencia de focos no tratados, o las chinches pueden sobrevivir en hábitats peridomésticos y reinvadir las viviendas tratadas ya sea por dispersión pasiva o por vuelos activos.

También debe considerarse la posibilidad de colonización de ecotopos artificiales por atracción a la luz, dado que en Costa Rica, Zeledón y colaboradores (2001) reportan este tipo de colonización en el peridomicilio. Están además las características de residualidad de los insecticidas sintéticos utilizados, los cuales han mostrado resultados satisfactorios en el domicilio pero han sido menos efectivos en áreas del peridomicilio. Esto se debe principalmente a la degradación de estos químicos por factores abióticos, principalmente en el peridomicilio. Otro factor que debe tomarse en consideración es la posibilidad de eclosión de huevecillos en casas rociadas, debido a que éstos no son sensibles a los insecticidas utilizados.

En la presente tesis se trabajó sobre *T. dimidiata* por ser el vector más importante en el país debido a su amplia distribución geográfica, encontrándose en 21 de los 22 departamentos (OPS 2002a) en

una variedad de ecotopos selváticos, además de encontrarse en el domicilio y peridomicilio, lo que dificulta su control. Esto aunado a otros factores contribuye a dificultar su control, observándose la necesidad de buscar alternativas a largo plazo para realizar intervenciones más eficientes que el control químico, el cual tiene caducidad (3 – 6 meses) del efecto residual.

Debido a que control de triatomino depende de acciones coordinadas e integradas dirigidas a mejorar las condiciones culturales y socioeconómicas, así como, el uso de métodos más eficientes y menos tóxicos (Lecuona *et al.* 2001), el control biológico es una alternativa que puede ser utilizada durante un período largo de tiempo, por ser autosostenible; siempre y cuando tenga las condiciones que favorezcan al sistema. Además de presentar otras indiscutibles ventajas sobre el control químico. Siendo los hongos entomopatógenos unos de los agentes biológicos más utilizados debido a su fácil reproducción, alto poder residual y patogénico, bajo costo de producción, aplicación por medio de equipo convencional utilizado en la agricultura, bajo impacto ambiental, fácil eliminación de excedentes, selectividad y forma de infección. Además, de haberse comprobado mediante pruebas de seguridad que los hongos hyphomycetes registrados (*Beauveria*, *Metarhizium* y *otros*) no presentan riesgos tangibles a vertebrados ni efectos secundarios sobre organismos acuáticos (Barrientos 2002, Rosas 2002, Toriello *et al.* 1999, Romaña & Fargues 1992).

Este trabajo representa una alternativa que amplía la información de patógenos del triatomino vector más importante del país, debido a que contribuye a la búsqueda de opciones sustitutivas o integrales al rociamiento con piretroides; que hasta el momento es el tipo de control utilizado desde el año 2000 cuando se inició la lucha antivectorial de la enfermedad de Chagas en Guatemala.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Evaluar el potencial de diferentes hongos entomopatógenos en *Triatoma dimidiata*.

5.2. Específicos

- 5.2.1. Determinar la patogenicidad y virulencia de tres cepas de *Beauveria bassiana* y cuatro cepas de *Metarhizium anisopliae* sobre ninfas del primer estadio a una concentración estándar.
- 5.2.2. Determinar la validez del uso de dos métodos, análisis Probit e interpolación gráfica (lineal), para estimar el tiempo necesario para matar al 50% de la población expuesta (TL₅₀).
- 5.2.3. Seleccionar la cepa más promisoría de cada especie de hongos entomopatógenos utilizadas en ninfas de primer estadio.
- 5.2.4. Determinar la susceptibilidad de huevecillos, ninfas del primer, tercer y quinto estadio, y adultos ante las dos cepas seleccionadas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Universo

6.1.1. *Triatoma dimidiata* (Latrielle)

Los cultivos de *T. dimidiata* provienen de colectas realizadas en 2002 y 2003 de cuatro diferentes departamentos: Santa Rosa, Jalapa, El Quiché y Jutiapa. Las chinches fueron mantenidas en el Insectario del Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología -LENAP- a temperatura controlada dentro de una cámara ambiental en oscuridad, a 26-28 °C y 80% de humedad relativa. Estos cultivos fueron alimentados con ratones (*Mus musculus* L.) y ratas (*Rattus norvegicus* Berkenhout) semanalmente, para aumentar la cantidad de especímenes al favorecer la reproducción incrementando la disponibilidad de alimento modificando la metodología de Tabaru (1995). Los insectos fueron alimentados y permanecieron en inanición siete días previos a los bioensayos.

6.1.2. Hongos entomopatógenos

Las cepas de hongos utilizadas en el estudio son las siguientes:

A. Cepas de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.

- Cepa **AES.Met.GC**, aislada de gallina ciega (Coleoptera), Agrícola El Sol (Guatemala)
- Cepa **AES.Met.MB**, aislada de mosca blanca (Homoptera: Aleyrodidae), Agrícola El Sol (Guatemala).
- Cepa **Met.EH.172**, aislada de mosca pinta (Homoptera: Cercopidae), en México. (UNAM, México).
- Cepa **Met.EH.347**, aislada de mosca blanca (Homoptera: Aleyrodidae), en Guatemala. (UNAM, México).

B. Cepas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin

- Cepa **AES.Bb.GC**, aislada de gallina ciega (Coleoptera), Agrícola El Sol (Guatemala).
- Cepa **AES.Bb.MB**, aislada de mosca blanca (Homoptera: Aleyroridae), Agrícola El Sol (Guatemala).
- Cepa **BB.EH.411**, aislada de larva de “eastern tent caterpillar” (Coleoptera), en E.E.U.U. (UNAM, México).

6.2. Métodos

6.2.1. Reactivación y posterior aislamiento de los hongos entomopatógenos

Para reactivar las cepas y mantener su virulencia se realizó una inoculación por inmersión de 10^7 conidios/ml de cada cepa sobre ninfas vivas de tercer estadio de *T. dimidiata*, una sola vez. Los insectos se mantuvieron en viales de vidrio a temperatura ambiente hasta su muerte. Bajo condiciones estériles las ninfas muertas se pasaron por diferentes soluciones en el siguiente orden: agua destilada (30 segs.), hipoclorito de sodio al 10% (1 min.), etanol al 70% (30 segs.) y solución salina al 0.9% (1 min.); posteriormente se introdujeron en cajas de petri de 90 x 15 mm con una bolita de algodón esterilizada humedecida con agua destilada estéril. Alrededor de cinco a seis días después los insectos con presencia de micelio se dejaron esporular, luego en la cámara de flujo laminar se procuró tomar un punto con la punta del asa para la siembra en medio de cultivo PDA en cajas de petri de 60 x 15 mm (Luz *et al.* 1999, Lecuona *et al.* 2001, Aléan 2003). Las cepas en el medio de cultivo PDA se mantuvieron durante 14 días a temperatura ambiente.

6.2.2. Producción masiva de los hongos

Para la producción masiva de los reaislamientos se utilizaron dos medios de cultivo sintéticos: Papa Dextrosa Agar (PDA) Merck ® con extracto de levadura al 5% y Saboraud Dextrosa Agar (SDA) más extracto de levadura al 5%. El medio de cultivo PDA fue utilizado para inducir el crecimiento micelial y el medio SDA para estimular la producción de esporas necesarias para la formulación emulsificable. Los aislamientos se incubaron a temperatura ambiente con luz indirecta, luego de producirse la esporulación los aislamientos fueron refrigerados a 5 °C aproximadamente para usarse después en los inóculos.

6.2.3. Obtención de los inóculos

Después de esporulados, se cosecharon los conidios de cada aislamiento realizando raspados para remover los mismos con un asa con punta de espátula. La solución madre del hongo de interés se obtuvo de los conidios removidos de los cultivos y suspendidos en solución acuosa con Tween 20 al 0.5% como surfactante. Para obtener la suspensión de conidios la solución fue agitada por un minuto en el vortex. Se utilizó la cámara de Neubauer y un microscopio de luz en 40 x para realizar los conteos, con tres repeticiones para determinar la concentración de la solución madre o inicial.

Para obtener la concentración de una solución se calculó como sigue:

$$\text{Solución en conidios/ml} = R1 \times 400 \times 10 \times 1000$$

donde: R1= Media de los conteos/20

A partir de la solución inicial se prepararon las diluciones hasta obtener las concentraciones deseadas volviendo a contar los conidios en una cámara para contar glóbulos rojos o Neubauer (Sagar 1999, Estrada 2003 com. pers.).

$$V2 = V1 + V_{H_2O}$$

donde: V2=volumen de concentración deseada

V1= factor de dilución x 10

Factor de dilución= C2/C1

donde: C2 = concentración deseada y

C1= concentración inicial

V_{H₂O}= volumen de agua

6.2.4. Selección de los aislamientos más promisorios

El trabajo se desarrolló en dos fases. La primera fase consistió en la evaluación de la patogenicidad de siete cepas sobre ninfas del primer estadio a una concentración estándar de 1×10^7 conidios/ml para la selección de los aislamientos más promisorios. Para determinar la cepa más virulenta de *Beauveria bassiana* y la de *Metarhizium anisopliae* se utilizó el menor tiempo letal medio (TL₅₀) como el criterio de selección. Para esto, se utilizaron tres réplicas por cada cepa con un control, con diez insectos en ayuno (siete días) por réplica. Después de obtenida la concentración estándar de cada una de las siete cepas a evaluar, se procedió a realizar la inoculación por inmersión a cada individuo durante seis segundos en la solución correspondiente (Luz *et al.* 1998, Lecuona *et al.* 2001). Dentro de la campana microbiológica, para evitar contaminación de los testigos primero se realizó la inmersión de éstos en la solución control, la cual consistió en agua desmineralizada estéril más Tween 20 al 0.5%. De igual manera se efectuó con los inóculos de las siete cepas a la concentración estándar. Las ninfas se colocaron de forma individual en viales de vidrio de 10cc preparados con fondo y pequeños biombos de papel filtro (esterilizados), utilizando parafilm perforado como tapa. Los viales de cada cepa fueron puestos en una bandeja de acero inoxidable y ésta dentro de una caja plástica con 100 ml de agua estéril; para obtener un sistema humidificante debido a que la incubadora no cuenta con el mismo.

Los insectos fueron mantenidos a 24.5°C (20°C T^o min., 29°C T^o máx.), con una humedad relativa de 90% (88% min., 92% máx.), en oscuridad y sin alimentación. La temperatura y humedad relativa (HR) fueron registradas diariamente, a través de un higrotermómetro dentro del sistema. Los datos de mortalidad diaria fueron utilizados para determinar el tiempo letal medio y noventa (TL₅₀ y TL₉₀) para cada una de las cepas de hongos entomopatógenos incluidos en el estudio. En base a estos resultados se seleccionó la cepa más promisoría de cada especie.

6.2.5. Viabilidad de la cepa no patogénicamente activa sobre *T. dimidiata*

La determinación de la viabilidad de las cepas no se contempló a realizarse previo a los bioensayos como algunos autores recomiendan (Luz *et al.* 1999, Hernández-Velásquez *et al.* 2000, Chitarra *et al.* 2004). Se realizó una prueba de germinación a la cepa AES.Met.MB (*M. anisopliae*) para determinar la viabilidad de los conidios después de la realización de los ensayos de patogenicidad para confirmar que esta cepa no fue patogénica a *T. dimidiata*. Para cuantificar la viabilidad de los conidios se preparó una suspensión estándar de conidios con Tween 20 al 0.5% y se incubó la misma a temperatura ambiente durante 24 hrs. Transcurrido el tiempo de incubación, se colocó 10µl de esta suspensión a ambos lados del hematocímetro para su conteo. Se contaron bajo microscopio óptico con contraste de fase los conidios germinados a las 24h, considerándose germinados cuando el tubo de germinación alcanzó la mitad de la longitud del conidio. El procedimiento se realizó con tres repeticiones para obtener la concentración de conidios germinados. Finalmente se calculó el porcentaje de conidios germinados sobre la diferencia entre la concentración de la solución inicial (conidios/ml) y la concentración final (conidios germinados/ml).

6.2.6. Evaluación de las cepas seleccionadas

La segunda fase del estudio consistió en la evaluación de las cepas seleccionadas como las más virulentas, AES.Bb.MB de *B. bassiana* y AES.Met.GC de *M. anisopliae*, para pruebas de patogenicidad en diferentes estados de desarrollo de la chinche. Los bioensayos se llevaron a cabo sobre huevecillos, ninfas del tercer y quinto estadios, además de adultos de *T. dimidiata* por inmersión en solución fúngica de cuatro concentraciones, la metodología fue descrita en el inciso 6.2.4. Los procedimientos de inmersión y el mantenimiento de los individuos inoculados se realizaron de forma individual en los bioensayos sobre los estadios ninfales y adultos. La inmersión

de los huevecillos se llevó a cabo por cada repetición, es decir, por grupo de 10 huevecillos. Para sumergirlos se usó una canasta de acero inoxidable de 40 mm de diámetro, la cual es utilizada para el montaje de tejidos en preparaciones permanentes y semipermanentes. Los huevecillos tenían de 24- 48 hrs de haber sido ovipuestos según lo sugerido por Romaña & Farges (1992).

Se realizaron tres réplicas para cada una de las concentraciones (y el control), con diez individuos por réplica de huevecillos y ninfas del tercer estadio; solamente se utilizaron diez individuos de quinto estadio y adultos. La ausencia de réplicas se debió a que los cultivos de las chinches sufrieron una apreciable baja debido a problemas con el termostato de la cámara ambiental por una descarga eléctrica. Se consideró muerta la chinche cuando no existía respuesta a estímulos físicos. El registro de la mortalidad se cuantificó diariamente durante un mes. Los individuos muertos (en huevecillos evidente depresión) se colocaron en una cámara húmeda para favorecer la esporulación para la prueba confirmatoria de muerte por infección del hongo inoculado.

6.2.7. Confirmación de micosis

Después de la esporulación la evaluación para la confirmación de muerte por micosis se realizó en un microscopio estereoscópico. En algunos casos fue necesario confirmar la identidad del hongo a través de preparaciones de cultivo en lámina para observar todas las estructuras del hongo con azul de lactofenol en el microscopio óptico compuesto, a partir del material obtenido de los cadáveres de los insectos. La presencia del hongo fue observada generalmente a las 48h de colocados los insectos en la cámara húmeda.

6.3. Análisis Estadístico

Fue utilizado un análisis de regresión para calcular el tiempo de respuesta-mortalidad (TL_{50} y TL_{90}) y concentración letal media y noventa (CL_{50} y CL_{90}) usando el modelo EPA Probit versión 1.5 (Romaña & Farges 1992, Figueroa *et al.* 2006, Al Mazra'awi 2007). Por otro lado se hizo un estudio de regresión logística para determinar el efecto del estadio de desarrollo y de la concentración en las posibilidades de muerte a través del programa SAS versión 9.00.

Para determinar la diferencia entre proporciones se usó la prueba z de proporciones, usando el programa Epidat versión 3.1 a un nivel de significancia de 0.05

6.3.1. Tiempo letal medio (TL₅₀)

Los datos de mortalidad diaria fueron utilizados para determinar el tiempo necesario para matar al 50% de la población expuesta de *T. dimidiata*. Para los ensayos sobre ninfas del primer estadio el TL₅₀ fue determinado a través de los métodos: interpolación gráfica lineal (Hernández *et al.* 2000, Lecuona *et al.* 2001) y análisis Probit (Romaña & Fargues 1992, Fuentes y Carcaballo 1995, Figueroa *et al.* 2006, Al Mazra'awi 2007). La interpolación gráfica es un método rápido y simple, que consiste en trazar una línea de la mortalidad y una de sobrevivencia de los individuos expuestos, la intersección de ambas líneas corresponde al TL₅₀. Se hizo una corrección al registro de la mortalidad por la fórmula de Abbott para estimar el tiempo letal medio utilizando interpolación gráfica. Como se mencionó anteriormente el TL₅₀ fue utilizado como el criterio de selección de las cepas utilizadas en la segunda fase. Mientras solamente se determinó el TL₅₀ a la concentración estándar (1×10^7 conidios/ml) sobre ninfas del tercer estadio en la segunda fase de los bioensayos. El tiempo letal medio no fue determinado por falta de réplicas para ninfas del quinto estadio y adultos.

6.3.2. Concentración letal media y noventa (CL₅₀ y CL₉₀)

Posteriormente de la selección de las dos cepas más promisorias por causar mortalidad al 50% de los individuos expuestos en menor tiempo, se procedió a evaluar las mismas sobre los tres estados de desarrollo de *T. dimidiata*, en cuatro concentraciones (2×10^7 , 1×10^7 , 2×10^6 y 2×10^5 conidios/ml), además del control; a temperatura y humedad relativa controladas. Los registros se llevaron a cabo diariamente en las boletas adjuntas (anexos 1 y 2), la mortalidad con micosis confirmada fue tomada como mortalidad real. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis Probit para calcular la concentración letal media y noventa (CL₅₀ y CL₉₀).

6.3.3. Susceptibilidad por el estadio de desarrollo y efecto de la concentración

Se hizo una prueba de regresión logística para estudiar el efecto del estadio de desarrollo y de la concentración en las posibilidades de muerte de las chinches. Para este análisis se utilizaron los

resultados de mortalidad confirmada por hongo de las cuatro concentraciones utilizadas, hasta los 15 días de observación. Los datos del control no fueron utilizados, debido a que se asume que se confirmó la causa de la muerte. Los análisis se hicieron en el programa estadístico SAS versión 9.00 (SAS Institute).

Para evaluar el ajuste entre el modelo y los datos se utilizó la prueba de Chi cuadrado, para posteriormente realizar la prueba de independencia condicional en la cual se obtuvieron las razones de posibilidades (Odds ratio=OR) sobre el efecto del estadio de desarrollo y del efecto de la concentración.

7. RESULTADOS

7.1. Evaluación de la actividad entomopatógena de las cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre *Triatoma dimidiata*

7.1.1. Pruebas de patogenicidad y selección de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre ninfas del primer estadio (N1) de *Triatoma dimidiata*

Como se observa en la tabla 1 las cepas evaluadas demostraron ser patogénicas a una concentración de 10^7 conidias/ml, a excepción de la cepa AES.Met.MB (*M. anisopliae*). En relación a las proporciones de mortalidad confirmada se determinó que no existe diferencia significativa ($p=0.99$) entre las cepas que presentaron el 100% de mortalidad y las que presentaron un 97% y 93%. De igual manera la diferencia entre la mortalidad corregida y confirmada no es significativa ($p=0.99$).

TABLA 1. Mortalidad acumulada (%) de ninfas del primer estadio de *Triatoma dimidiata* causada por cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* durante 30 días de exposición.

Especie/Cepa	días ¹	% Mortalidad Acumulada		
		Observada ²	Corregida ³	Confirmada ⁴
<i>B. bassiana</i>				
AES.Bb.MB	10	100	100	97
AES.Bb.GC	9	100	100	100
BB.EH.411	16	100	100	100
<i>M. anisopliae</i>				
Met.EH.347	11	100	100	93
Met.EH.172	10	100	100	100
AES.Met.GC	13	100	100	100
AES.Met.MB	30	10	0	0

¹ Exposición total en días para alcanzar la totalidad de insectos muertos expuestos al inóculo.

² Insectos muertos durante 30 días después de la inoculación.

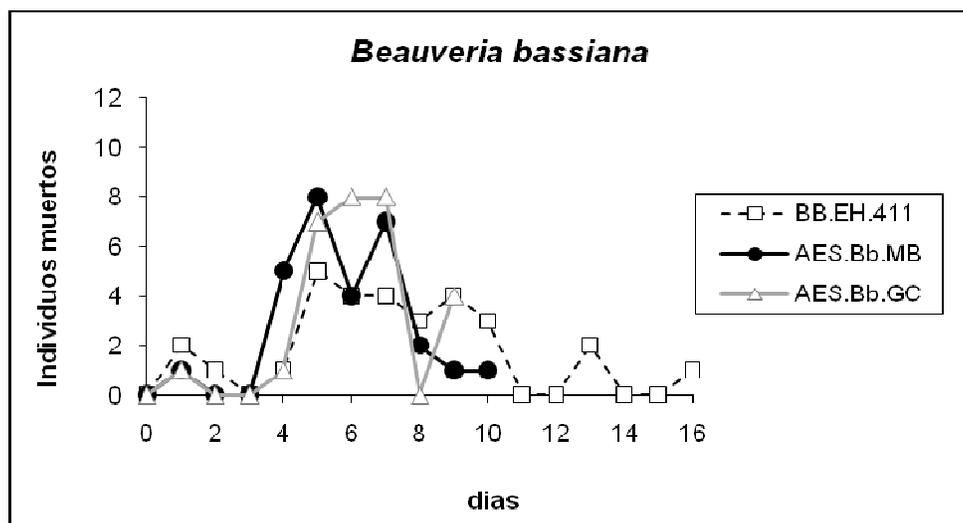
³ Mortalidad modificada con la fórmula de Abbott, por el 10% de mortalidad obtenida en el testigo.

⁴ Insectos muertos y esporulados con el hongo inoculado.

Posteriormente a los bioensayos, se llevó a cabo una prueba de viabilidad a la cepa AES.Met.MB, en la cual se obtuvo una germinación del 75% en 24 horas de incubación. Esta prueba se realizó para verificar la viabilidad de esta cepa de *Metarhizium* debido a que durante el proceso de reactivación la misma no presentó crecimiento sobre la chinche.

7.1.1.1. Mortalidad diaria

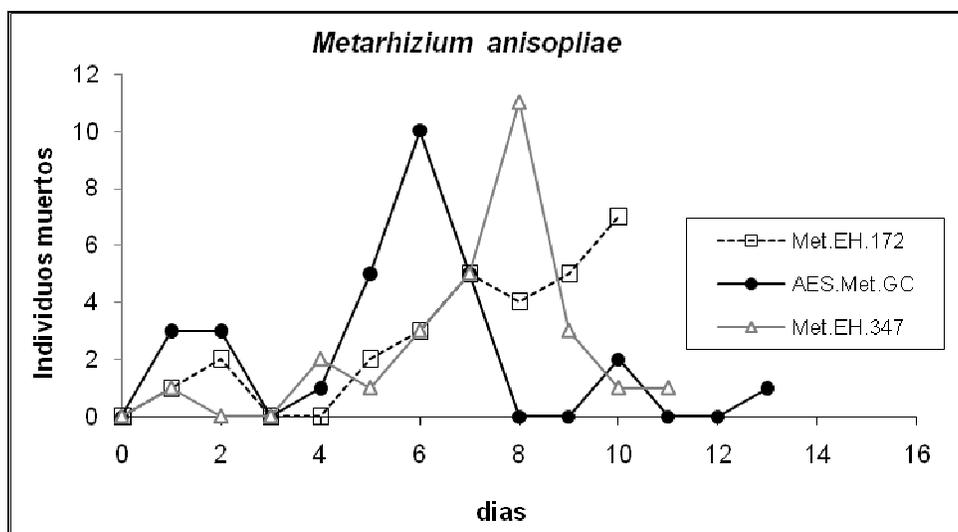
En las curvas de mortalidad diaria (gráficas 1 y 2) se puede observar el patrón de la mortalidad confirmada a través del tiempo. En las cepas de *B. bassiana* gráfica 1, el punto máximo de muertes corresponde al rango entre los días cinco y siete, en el cual se concentró la mayor mortalidad causada por AES.Bb.GC y AES.Bb.MB; con un decrecimiento marcado en la mortalidad en los días subsiguientes. Mientras el patrón observado con BB.EH.411 fue bastante variable, de forma sinuosa con numerosos picos dispersos no mayores a cinco individuos en mortalidad diaria; esta baja eficiencia tuvo como consecuencia el mayor tiempo necesario para alcanzar la mortalidad total de las ninfas expuestas, comparada con las dos anteriores.



GRÁFICA 1. Mortalidad diaria de ninfas del primer estadio de *Triatoma dimidiata* causada por cepas de *Beauveria bassiana* (Bb.EH.411, AES.Bb.MB y AES.Bb.GC).

Para las cepas de *M. anisopliae* (gráfica 2), Met.EH.347 alcanzó el punto máximo de 11 ninfas muertas el día ocho, seguido de un evidente descenso en la mortalidad de la población expuesta a este inóculo. El comportamiento en la eficiencia diaria de la cepa AES.Met.GC se mantuvo

inicialmente en un 10% de mortalidad (tres ninfas), alcanzando el día seis un valor máximo de 10 ninfas. A partir del momento en que alcanza este valor máximo comienza a descender, registrando el mayor tiempo necesario para causar la totalidad de muerte en las ninfas de primer estadio (N1) para los tratamientos con *M. anisopliae*. En relación al patrón observado con Met.EH.172, ésta fue la única cepa que exhibió una tendencia gradual en aumento, con siete individuos muertos el día 10, correspondiente al día en que se completó la mortalidad de la población expuesta a ésta.



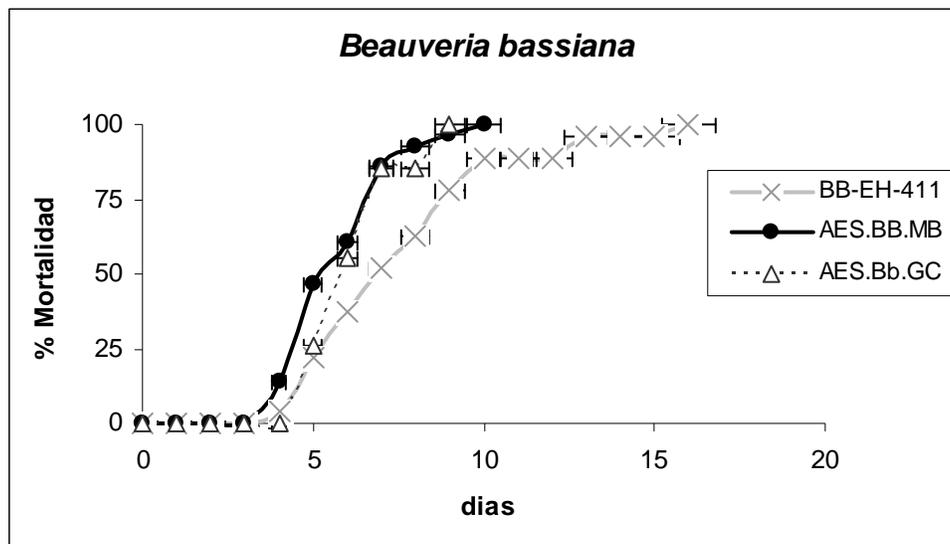
GRÁFICA 2. Mortalidad diaria de ninfas del primer estadio de *Triatoma dimidiata* causada por cepas de *Metarhizium anisopliae* (Met.EH.347, Met.EH.172 y AES.Met.GC).

7.1.1.2. Virulencia y Determinación del tiempo letal medio (TL₅₀)

En las gráficas de mortalidad acumulada (gráficas 3 y 4) y en la tabla de los tiempos letales medios (tabla 2) se puede observar que las cepas presentaron una alta pendiente. Sobresalen Met.EH.347 (*M. anisopliae*), AES.Bb.GC y AES.Bb.MB (*B. bassiana*) con valores de 12.00, 11.51 y 8.17 respectivamente, lo que indica una respuesta homogénea.

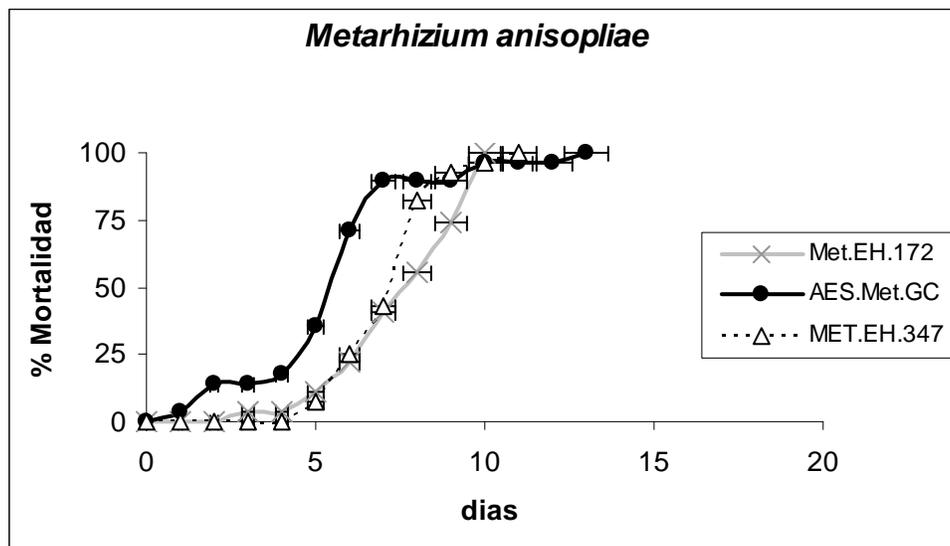
Las tres cepas de *B. bassiana* en la gráfica 3, exhiben una pendiente de inicio relativamente tardío en comparación con *M. anisopliae*. La pendiente de la cepa BB.EH.411 es la más baja de los tratamientos con *B. bassiana*. Esta cepa, además, presentó un tiempo letal medio (TL₅₀) significativamente mayor a los de AES.Bb.GC y AES.Bb.MB a juzgar por la ausencia de traslape de

los límites de confianza al 95% (tabla 2). Mientras estas otras cepas no fueron diferentes entre sí ni en tiempo letal medio ni en pendientes.



GRÁFICA 3. Mortalidad acumulada (%) de ninfas del primer estadio de *Triatoma dimidiata* en respuesta a cepas de *Beauveria bassiana* (Bb.EH.411, AES.Bb.MB y AES.Bb.GC) durante 30 días de exposición.

En relación a las cepas de *M. anisopliae* se observa que la cepa Met.EH.172 presentó una pendiente poco pronunciada y de aparición relativamente tardía, con un tiempo letal medio mayor a las otras cepas del hongo (gráfica 4 y tabla 2). Esto puede confirmarse en la gráfica 2, donde se observa una baja mortalidad a través del tiempo. Anteriormente se mencionó que Met.EH.347 presentó la mayor pendiente (gráfica 4 y tabla 2), que se traduce en mayor porcentaje de mortalidad en un período corto de tiempo. En la gráfica 4 es evidente que la cepa AES.Met.GC alcanzó un 90% de mortalidad acumulada en los primeros siete días postinoculación, registrando el menor tiempo letal medio (TL₅₀) para las cepas de *M. anisopliae*, pero el mayor tiempo necesario para causar la totalidad de muerte en las ninfas.



GRÁFICA 4. Mortalidad acumulada (%) de ninfas del primer estadio de *Triatoma dimidiata* en respuesta a cepas de *Metarhizium anisopliae* (Met.EH.347, Met.EH.172 y AES.Met.GC) durante 30 días de exposición.

Se determinaron los tiempos letales para evaluar la agresividad o rapidez de acción de las cepas de los hongos entomopatógenos sobre la población expuesta a las mismas. La tabla 2 presenta los tiempos letales medios (TL₅₀) para las cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre ninfas del primer estadio a una concentración estándar de 1 x 10⁷ conidios/ml. El estadístico χ^2 (chi cuadrado) calculado resultó menor al χ^2 tabulado, indicando que los resultados se ajustan al modelo Probit ($p > 0.05$). Este ajuste fue comprobado al realizar una interpolación gráfica lineal (IG).

Los resultados (tabla 2) muestran que las diferentes cepas de ambas especies presentaron una infectividad similar, con un rango que oscila entre 5.3 y 7.6 días para alcanzar el tiempo letal medio. Todas las cepas evaluadas fueron altamente patogénicas (excepto AES.Met.MB), lograron el 100% de mortalidad corregida (10% mortalidad testigo) y sobrepasaron el 90% de mortalidad confirmada, como se observa en tabla 1, y figs. 3 y 4.

TABLA 2. Tiempo letal medio (TL₅₀) en ninfas del primer estadio de *Triatoma dimidiata* causada por cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

Especie/Cepa	Intercepto ± DE	Pendiente ± DE	TL ₅₀ en días		χ ² Calc. *	χ ² Tab. *
			IG ¹	Log-Probit ²		
<i>B. bassiana</i>						
AES.Bb.MB	-0.91 ± 0.86	8.17 ± 1.12	5.4	5.3 (4.8-5.7) a	1.35	14.07
AES.Bb.GC	-3.71 ± 1.75	11.51 ± 2.29	5.8	5.7 (5.3-6.1) a	0.38	11.07
BB.EH.411	-0.00 ± 0.69	6.01 ± 0.76	6.6	6.8 (6.1-7.4) b	1.79	19.68
<i>M. anisopliae</i>						
Met.EH.347	-5.08 ± 1.59	12.00 ± 1.82	7.2	6.9 (6.5-7.3) b	1.66	14.07
Met.EH.172	-1.54 ± 1.44	7.45 ± 1.67	7.4	7.6 (6.9-8.3) b	1.44	14.07
AES.Met.GC	-0.15 ± 0.85	7.02 ± 1.06	5.3	5.4 (4.8-5.9) a	6.62	15.51

IG¹= Tiempo letal medio en días, obtenido a través de interpolación gráfica.

Log-Probit²= Tiempo letal medio en días, obtenido por programa Probit estableciendo una relación lineal entre tiempo y mortalidad. Valores seguidos por la misma literal no son diferentes de manera significativa por superposición de límites ($P < 0.05$).

* $P > \alpha$ para aceptar Ho=modelo se ajusta.

En la tabla 2 se observa que AES.Met.GC (*M. anisopliae*) presentó el TL₅₀ significativamente menor. Mientras que para *B. bassiana* las cepas AES.Bb.GC y AES.Bb.MB tuvieron el menor TL₅₀ sin diferencia significativa entre ambas por superposición de los límites de confianza al 95%. Bajo este criterio, sería indistinto seleccionar a una u otra cepa. Por lo tanto, con el fin de sumar al menor tiempo letal medio otro criterio para afinar la selección de las cepas más promisorias se comparó los resultados al día ocho después de la inoculación, correspondiente al día en que el primer aislamiento alcanzó el 90% de mortalidad corregida (tabla 3).

La tabla 3 muestra que la mortalidad acumulada inicialmente a los cuatro días postinoculación causada por AES.Bb.MB (14.3%) fue superior a la ocasionada por AES.Bb.GC (0.3%) en un 14%; luego tiene un incremento significativo a los ocho días (92.9%) con una diferencia del 7.7% con respecto a AES.Bb.GC (85.2%), ambas cepas de *B. bassiana*. Mientras que para *M. anisopliae* la mortalidad acumulada originada por AES.Met.GC a los cuatro y ocho días fue mucho mayor en

relación a las otras cepas de este hongo, en congruencia al menor TL_{50} obtenido (tabla 2). Por lo tanto, se seleccionó las cepas AES.Bb.MB de *B. bassiana* y AES.Met.GC de *M. anisopliae*, para la segunda fase de las pruebas de patogenicidad en diferentes estados de desarrollo del triatomino.

TABLA 3. Comparación del Porcentaje de Mortalidad Acumulada de ninfas del primer estadio de *Triatoma dimidiata* causada a diferentes días por cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

Especie/Cepa	% Mortalidad ¹		
	4 días	8 días	12 días
<i>B. bassiana</i>			
AES.Bb.MB	14.3	92.9	100.0
AES.Bb.GC	0.3	85.2	100.0
BB.EH.411	3.7	63.0	88.9
<i>M. anisopliae</i>			
Met.EH.347	0.0	82.1	100.0
Met.EH.172	3.9	55.7	100.0
AES.Met.GC	17.9	89.3	96.4

¹ Mortalidad corregida con fórmula de Abbott.

7.1.2. Efecto entomopatígeno de las cepas seleccionadas *Beauveria bassiana* AES.Bb.MB y *Metarhizium anisopliae* AES.Met.GC sobre estados de desarrollo de *Triatoma dimidiata*

7.1.2.1. Huevecillo

Ambas cepas mostraron un efecto patogénico contra los huevecillos de este triatomino a partir de la concentración 2×10^5 conidios/ml correspondiente a la concentración utilizada más baja, como puede observarse en la tabla 4. El control no presentó huevecillos infectados, eclosionando el 100%, por lo que la mortalidad observada es la real.

Todos los tratamientos con *Metarhizium* causaron el mayor número de huevecillos infectados siendo significativamente diferente a los tratados con *B. bassiana*, en las concentraciones más bajas, 2×10^5 y 2×10^6 conidios/ml. Se puede observar en la tabla 4 y gráfica 5 que a partir de la concentración

2x10⁵ conidios de *Metarhizium*/ml ya hubo reducción de la eclosión: solamente emergió un 14.3% de los huevecillos expuestos; lo que equivale a un 85.7% de huevecillos infectados. A partir de la siguiente concentración evaluada 2x10⁶ conidios/ml, que es solo 10 veces mayor, la eclosión fue inhibida al 100%.

TABLA 4. Patogenicidad de las cepas seleccionadas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* a cuatro concentraciones sobre huevecillos.

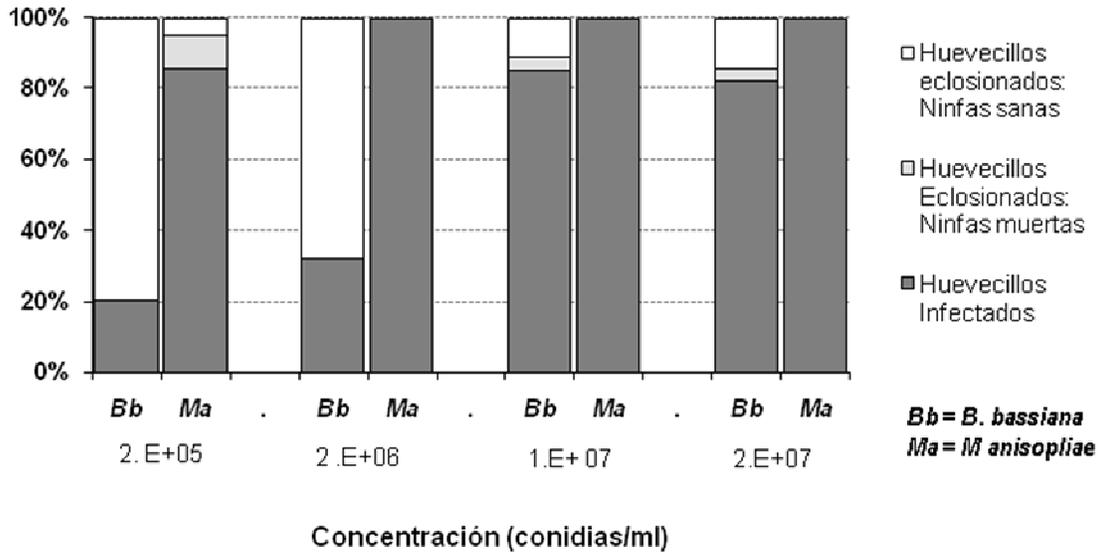
Especie/Cepa	Concentración conidios/ml	% Acumulado		
		Huevecillos Infectados ¹	Huevecillos eclosionados Ninfas muertas ²	Ninfas sanas
<i>B. bassiana</i> AES.Bb.MB	2x10 ⁵	20.0	0.0	80.0
	2x10 ⁶	32.0	0.0	68.0
	1x10 ⁷	85.2	3.7	11.1
	2x10 ⁷	82.1	3.6	14.3
<i>M. anisopliae</i> AES.Met.GC	2x10 ⁵	85.7	9.5	4.8
	2x10 ⁶	100.0	0.0	0.0
	1x10 ⁷	100.0	0.0	0.0
	2x10 ⁷	100.0	0.0	0.0

¹Micosis directa, muerte de embrión.

²Ninfas emergidas de los huevecillos sometidos al inóculo y posteriormente muertas con infección indirecta del hongo.

Los huevecillos sometidos a inóculos de *B. bassiana* AES.Bb.MB, fueron menos susceptibles. Esta cepa fue notablemente menos agresiva permitiendo porcentajes de eclosión de 80.0, 68.0, 14.8 y 17.9 en los inóculos 2x10⁵, 2x10⁶, 1 x10⁷ y 2 x10⁷ conidios/ml respectivamente (tabla 4 y gráfica 5). En las concentraciones 2x10⁵, 2x10⁶ y 1 x10⁷ conidios/ml se observa una respuesta inversamente proporcional de eclosión, dicha respuesta es la esperada; el porcentaje de infección aumentó conforme se incrementó la concentración. El inóculo de 2 x10⁷ conidios/ml presentó una respuesta atípica de mortalidad de embriones (huevecillos infectados) debido a que permitió un 3.1% más de huevecillos eclosionados que la concentración 1 x10⁷ conidios/ml (tabla 4), sin embargo, esta diferencia no fue significativa (p=0.95). Un comportamiento similar fue observado en ninfas del quinto estadio y adultos.

Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae



GRÁFICA 5. Efecto de cuatro concentraciones de *Beauveria bassiana* AES.Bb.MB y *Metarhizium anisopliae* AES.Met.GC sobre huevecillos de *Triatoma dimidiata* y su efecto posterior (micosis indirecta) sobre ninfas emergidas.

Las ninfas emergidas de los huevecillos tratados fueron afectadas por AES.Bb.MB (*B. bassiana*) y AES.Met.GC (*M. anisopliae*) con diferente intensidad. Para la cepa AES.Bb.MB sólo las altas concentraciones, 1×10^7 y 2×10^7 conidios/ml, causaron la muerte por micosis indirecta a dos de 42 ninfas emergidas. Mientras la menor concentración evaluada 2×10^5 conidios/ml de la cepa de *Metarhizium* provocó una mayor mortalidad por micosis indirecta, dos de tres ninfas emergidas de los huevecillos expuestos a este inóculo (tabla 4 y gráfica 5).

7.1.2.2. Estado ninfal y adulto

7.1.2.2.1. Determinación del Tiempo letal

Para evaluar la rapidez de acción de las cepas seleccionadas se determinó el tiempo para matar al 50% de la población expuesta (TL_{50}) de ninfas del tercer estadio (N3), a la concentración de 1×10^7

conidios/ml. En la tabla 5 se compara el TL₅₀ de ninfas del primer y tercer estadios (N1 y N3), en la cual el estadístico χ^2 calculado es menor al χ^2 tabulado, lo cual indica ajuste al modelo Probit.

Asimismo, se puede observar que ambas cepas presentaron una alta pendiente en el primer estadio ninfal, con valores de 8.17 y 7.02 para AES.Bb.MB (*B. bassiana*) y AES.Met.GC (*M. anisopliae*) respectivamente, lo que indica que hay grandes aumentos en la mortalidad en períodos cortos de tiempo.

Los resultados (tabla 5) muestran que sobre las ninfas del primer estadio las dos cepas presentaron un TL₅₀ significativamente menor a los TL₅₀ en ninfas del tercer estadio. La cepa AES.Met.GC necesitó 7.7 días y la cepa AES.Bb.MB 10.5 días para matar al 50% de la población expuesta de N3, con ausencia de traslape de los límites de confianza en un nivel de significancia 0.05.

TABLA 5. Tiempo letal medio (TL₅₀) en ninfas del primer y tercer estadios de *Triatoma dimidiata* causada por las cepas seleccionadas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

Especie/Cepa	Estadio ninfal	Intercepto ± DE	Pendiente ± DE	TL ₅₀ en días Log-Probit ¹	χ^2 Calc. *	χ^2 Tab. *
<i>B. bassiana</i>						
AES.Bb.MB	N1	-0.91 ± 0.86	8.17 ± 1.12	5.3 (4.8-5.7) a	1.35	14.07
	N3	0.50 ± 0.71	4.40 ± 0.62	10.5 (9.2-11.6) c	8.07	22.36
<i>M. anisopliae</i>						
AES.Met.GC	N1	-0.15 ± 0.85	7.02 ± 1.06	5.4 (4.8-5.9) a	6.62	15.51
	N3	1.62 ± 0.43	3.81 ± 0.44	7.7(6.7 -8.5) b	17.06	25.00

Log-Probit¹= Tiempo letal medio en días, obtenido por programa Probit estableciendo una relación lineal entre tiempo y mortalidad. Valores seguidos por la misma literal no son diferentes de manera significativa por superposición de límites ($P < 0.05$).

* $P > \alpha$ para aceptar Ho=modelo se ajusta.

7.1.2.2.2. Susceptibilidad por estadio de desarrollo

En general los estados de desarrollo de *T. dimidiata* (huevecillo, ninfa y adulto) fueron susceptibles al ataque de *B. bassiana* AES.Bb.MB y *M. anisopliae* AES.Met.GC. Se determinó que, el estado – ninfa o adulto- condicionaba la posibilidad de muerte de las chinches de *T. dimidiata* expuestas a *M.*

anisopliae ($p=0.0053$) y a *B. bassiana* ($p=0.0014$), independiente de la concentración de inóculo. La concentración de 2×10^7 conidios/ml presentó datos atípicos en el estadio N5, imputable a la falta de réplicas, por lo que esta concentración fue excluida de los cálculos de estimación de riesgo según el estadio; así los datos se ajustaron al modelo con un $\chi^2=7.67$, con 4 gl (*Beauveria*) y $\chi^2=9.86$, con 6 gl (*Metarhizium*).

TABLA 6. Razón de posibilidades (Odds ratio=OR) de muerte de *T. dimidiata* según su estadio y tipo de inóculo, controlado por concentración.

Estadios comparados	<i>B. bassiana</i> p=0.0014		<i>M. anisopliae</i> p=0.0053	
	OR	IC 95%	OR	IC 95%
N3 vs N5	0.411	0.129 - 1.309	0.300	0.077 - 1.170
Adulto vs N3	8.089	2.306 -28.376	5.565	1.500 - 20.645
Adulto vs N5	3.324	0.752 -14.694	1.670	0.286 - 9.759

La tabla 6 expone los resultados del estudio de regresión logística en el que se analizó el efecto del estado y estadio de desarrollo en las posibilidades de muerte de las chinches hasta los 15 días de observación. En esta tabla comparativa se muestran los valores de “odds ratio” y sus correspondientes límites de confianza al 95%. A través de los resultados se dedujo que independientemente de la concentración para ambos hongos, las posibilidades de muerte (susceptibilidad) de una chinche adulto y de una N5 no son significativamente diferentes; ni entre N3 y N5. Sin embargo, los adultos fueron más susceptibles que las ninfas del tercer estadio, en al menos 50% (1-LI) para *Metarhizium* y 130% (1-LI) para *Beauveria* de posibilidad de muerte. Estos resultados preliminares muestran una asociación entre el estado –ninfa/adulto- y la posibilidad de muerte de la chinche *T. dimidiata*.

7.1.2.2.3. Determinación de la Concentración letal

Se determinó la concentración letal media y noventa (CL_{50} y CL_{90}) de la cepa de *B. bassiana* AES.Bb.MB en ninfas del tercer estadio y huevecillos. Como se observa en la tabla 7, no hubo diferencia significativa entre huevecillos y ninfas del tercer estadio en la CL_{50} y CL_{90} , por presencia de traslape de los límites de confianza al 95%. AES.Bb.MB mostró intervalos de confianza amplios en CL_{90} para ambos estados de desarrollo. Mientras que para la cepa de *M. anisopliae* AES.Met.GC

no se determinó las concentraciones letales; debido a que la mortalidad acumulada confirmada 30 días después de la inoculación fue muy alta en los tratamientos para establecer una relación lineal entre concentración y mortalidad.

TABLA 7. Concentraciones letales de *Beauveria bassiana* AES.Bb.MB y *Metarhizium anisopliae* AES.Met.GC para huevecillos y ninfas de *Triatoma dimidiata* a los 30 días después de inoculación.

Estado	Cepa	CL ₅₀ (IC 95%)	CL ₉₀ (IC 95%)
Huevecillos	AES.Bb.MB	0.8 (0.3 –1.5) a	12.4 (5.7 – 50.5) b
	AES.Met.GC	ND	ND
Ninfas del tercer estadio	AES.Bb.MB	2.3 (1.0 –4.2) a	38.2 (16.7 - 196.7) b
	AES.Met.GC	ND	ND

IC: Intervalos de confianza al 95%, valores seguidos por la misma literal no son diferentes de manera significativa por superposición de límites ($P < 0.05$).

Todos los valores multiplicados por 10^6 .

ND: No determinado debido a que la mortalidad acumulativa confirmada es muy alta para establecer una relación lineal entre concentración y mortalidad.

Se calculó la CL₅₀ de las cepas sobre ninfas y adultos de *T. dimidiata* a los siete y 10 días postinoculación, debido a que en algunos estadios la mortalidad era muy alta a los 15 días o la mortalidad con concentraciones 10^7 se presentó de forma atípica, lo que no permitió una correlación lineal entre concentración y mortalidad, y esto puede ser atribuible a la falta de réplicas en ninfas del quinto estadio y adultos. Las CL₅₀'s obtenidas para *M. anisopliae* AES.Met.GC en *T. dimidiata* (N3, N5 y adulto) se encuentran entre $0.6 - 5.5 \times 10^6$ conidias/ml (tabla 8).

Se comparó los porcentajes de mortalidad mediante la prueba de diferencia de proporciones Z, la cepa AES.Met.GC (*M. anisopliae*) causó mayor porcentaje de mortalidad ($p=0.0122$) en huevecillos, ninfas del tercer estadio, ninfas del quinto estadio y adultos.

TABLA 8. Estimación relativa de la concentración letal media (CL₅₀) para ninfas y adultos de *Triatoma dimidiata* a *Beauveria bassiana* AES.Bb.MB y *Metarhizium anisopliae* AES.Met.GC.

Estado/Estadio	Cepa	CL ₅₀ (IC 95%)	
		7d	10 d
Ninfas del tercer estadio	AES.Bb.MB	a	24.8 (7.4 – 1957.3)
	AES.Met.GC	5.5 (3.5 – 8.3)	b
Ninfas del quinto estadio	AES.Bb.MB	a	a
	AES.Met.GC	5.4 (1.4 – 17.2)	0.6 (0.0 – 1.8)
Adultos	AES.Bb.MB	a	a
	AES.Met.GC	a	1.4 (0.1 – 5.8)

IC: Intervalos de confianza al 95%.

Todos los valores multiplicados por 10⁶.

a: mortalidad acumulada confirmada a los 7 días después de la inoculación menor al 50%.

b: mortalidad acumulada confirmada a los 10 días después de la inoculación muy alta para establecer una relación lineal entre concentración y mortalidad.

7.1.2.2.4. Efecto de la Concentración

Las posibilidades de muerte hasta los 15 días de observación fueron comparadas entre las distintas concentraciones de inóculo y controlando por el estadio por medio de regresión logística, la cual se ajustó al modelo con un $\chi^2=7.67$, con 4 gl (*Beauveria*) y $\chi^2=9.86$, con 6 gl (*Metarhizium*). No obstante, como se mencionó anteriormente para la cepa AES.Bb.MB (*B. bassiana*) fue necesario excluir los resultados de la concentración 2×10^7 por haber presentado un bajo porcentaje de mortalidad atípico ($p= 0.0037$) en ninfas del quinto estadio debido a la falta de réplicas.

Las pruebas de independencia condicional para la concentración demostraron que la posibilidad de muerte de una chinche aumenta al incrementar la concentración, tanto para los inóculos con *M. anisopliae* ($p<0.0001$) como para aquellos con *B. bassiana* ($p<0.0001$). Esta asociación es homogénea tanto para adultos como para ninfas del tercer y quinto estadios. Los valores de “odds ratio” con sus límites de confianza (95%) obtenidos en las comparaciones de concentraciones se presentan en la tabla 9, estratificadas según el inóculo.

TABLA 9. Razón de posibilidades (Odds ratio=OR) de muerte de *T. dimidiata* según concentraciones y cepa inóculo, controlado por el estadio.

Concentraciones comparadas	<i>B. bassiana</i> p<0.0001		<i>M. anisopliae</i> p<0.0001	
	OR	IC 95%	OR	IC 95%
2x10 ⁵ vs 2x10 ⁶	0.344	0.127 - 0.931	0.836	0.339 - 2.061
2x10 ⁵ vs 1x10 ⁷	0.033	0.008 - 0.141	0.063	0.013 - 0.300
2x10 ⁵ vs 2x10 ⁷	ND	ND	0.063	0.013 - 0.298
2x10 ⁶ vs 1x10 ⁷	0.097	0.025 - 0.380	0.075	0.016 - 0.361
2x10 ⁶ vs 2x10 ⁷	ND	ND	0.075	0.016 - 0.359
1x10 ⁷ vs 2x10 ⁷	ND	ND	0.998	0.133 - 7.510

ND= No determinado

Los resultados de la tabla 9, indican una asociación de la concentración con la posibilidad de muerte de *T. dimidiata*. Como era de esperarse la mayor diferencia de susceptibilidad o de posibilidad de muerte de una chinche se observó entre la concentración más baja y las más altas. Las posibilidades de muerte al menos 70% (1-LS) más bajas con la concentración 2 x 10⁵ conidias/ml que con las concentraciones 10⁷ de *M. anisopliae* AES.Met.GC; y al menos 86% (1-LS) con la concentración 1 x 10⁷ que con 2 x 10⁵ conidias/ml con la cepa AES.Bb.MB, *B. bassiana*. En cuanto a las concentraciones 2 x 10⁵ y 2 x 10⁶ conidias/ml no son significativamente diferentes las posibilidades de muerte de una chinche tratada con AES.Met.GC; mientras la cepa AES.Bb.MB presenta poca diferencia de al menos 7% (1-LS) más baja con la menor concentración, al incrementar la concentración 2 x 10⁵ a 2 x 10⁶ conidias/ml. Para ambos hongos los inóculos con las concentraciones 2 x 10⁶ y 1 x 10⁷ conidias/ml causaron una diferencia de alrededor del 60% (1-LS) más baja la posibilidad de muerte con los inóculos de menor concentración.

8. DISCUSIÓN

8.1. Primera Fase: Selección de cepas

Las cepas evaluadas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* demostraron ser patogénicas y virulentas sobre *T. dimidiata*. A excepción de la cepa AES.Met.MB (*M. anisopliae*), las otras seis cepas presentaron una alta mortalidad confirmada (93% - 100%) acumulada a los 16 días postinoculación sin diferencias significativas ($p=0.99$). Se considera que la concentración utilizada en la primera fase 1×10^7 , sobre ninfas del primer estadio, fue determinante para que no se haya dado una diferencia en la mortalidad. Fuentes y Carcaballo (1995) obtuvieron resultados similares en aislamientos de *B. bassiana* sobre larvas de lepidópteros en concentraciones 10^9 , 10^8 , y 10^7 , por lo que para optimizar la selección sugieren utilizar concentraciones menores a 10^7 para obtener diferencias significativas entre aislamientos.

La cepa AES.Met.MB fue aislada de mosca blanca (Aleyrodidae), especie que pertenece al orden Homoptera. Independientemente de las diferentes clasificaciones taxonómicas en las que han sido ubicados los homópteros, éstas convergen en la relación filogenética existente entre este grupo y Hemiptera (Triatominae), por tener un ancestro común. Por lo que se esperaba que la cepa AES.Met.MB fuera patógena sobre *T. dimidiata*; sin embargo, previo a los bioensayos durante el proceso de reactivación de la cepa no se observó crecimiento del hongo inoculado. Por esta razón se realizó una prueba de viabilidad para esta cepa, en la cual se obtuvo una germinación bastante aceptable (75%). Sin embargo, de acuerdo a Vélez y colaboradores (citados por Aleán 2003) no es suficiente para una formulación comercial, ya que para esto debe tener una germinación superior al 85% en un tiempo de incubación de 24 horas.

El hecho que AES.Met.MB no presentara infectividad a *T. dimidiata* podría apoyar la postura que defiende la existencia de especificidad patogénica (huésped-patógeno). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la cepa presenta un rango restringido de acción inclusive hasta especie específica. Al Mazra'awi (2007) hace referencia que se ha demostrado que la patogenicidad de los hongos entomopatógenos varía dentro de las especies dependiendo del aislamiento. En el presente estudio la relación filogenética entre el hospedero de origen y el potencial hospedero no garantizó la patogenicidad de la cepa.

En el patrón de mortalidad confirmada a través del tiempo de las cepas, se observó que la curva del rango máximo de muertes (zona de éxito) contiene al tiempo letal medio (TL_{50}), el cual representa el tiempo necesario para matar al 50% de la población expuesta. Esta correspondencia se observó en las cepas AES.Bb.GC, AES.Bb.MB, BB.EH.411, AES.Met.GC y Met.EH.347. Éstas mostraron una tendencia de curva normal con una zona de éxito en la mortalidad diaria correspondiente a la fase estacionaria en una curva de crecimiento poblacional. Únicamente Met.EH.172 mostró una tendencia gradual en aumento, este comportamiento exponencial de le valió el mayor valor absoluto de TL_{50} de todas las cepas. En cuanto a la mortalidad acumulada, cinco de las seis cepas presentaron altas pendientes lo que significa que durante pequeños intervalos de tiempo se obtuvo gran cantidad de muertes de las ninfas de primer estadio expuestas. BB.EH.411 fue la cepa con la pendiente menos pronunciada, asociada a una zona de éxito amplia de mortalidad diaria y un TL_{50} significativamente mayor ($p < 0.05$) comparado con las otras cepas de *Beauveria* (AES.Bb.MB y AES.Bb.GC).

Como objetivo metodológico del análisis de resultados se determinó la validez de los valores obtenidos a través de dos métodos frecuentemente utilizados como son Probit (Romaña & Fargues 1992, Fuentes y Carcaballo 1995, Al Mazra'awi 2007) e interpolación gráfica lineal -IG- (Hernández *et al.* 2000, Lecuona *et al.* 2001), para calcular el tiempo letal medio (TL_{50}). El ajuste al modelo Probit fue comprobado al realizar una interpolación gráfica, la cual es una interpretación simple y rápida. El hecho que los TL_{50} obtenidos por IG se encuentran dentro de los intervalos de confianza de los TL_{50} obtenidos por el análisis Probit, demuestra la concordancia de los parámetros obtenidos por ambos métodos. Por otra parte, los valores bajos de χ^2 y las altas pendientes, sugieren que las ninfas del primer estadio presentaron una frecuencia relativamente alta de individuos susceptibles a los hongos utilizados en los bioensayos en un espacio corto de tiempo.

Badilla y Alves (citado por Fuentes y Carcaballo, 1995) indican que la virulencia de un entomopatógeno se puede expresar a través del TL_{50} , bajo condiciones controladas. El tiempo letal se estimó para evaluar la rapidez de acción de las cepas de los hongos entomopatógenos sobre ninfas del primer estadio a una concentración estándar de 1×10^7 conidios/ml. Aunque inicialmente en la presente investigación se encontraba establecido el menor TL_{50} como el criterio para la selección de la cepa más promisorio de cada especie (*B. bassiana* y *M. anisopliae*) para la segunda

fase del estudio, se estableció que además del menor TL₅₀ se utilizaría la mayor mortalidad acumulada a los ocho días postinoculación. Este otro factor fue sumado debido a que AES.Bb.MB y AES.Bb.GC no presentaron diferencia significativa ($p > 0.05$) en el TL₅₀, para la selección de la cepa de *B. bassiana*. Por lo que se seleccionó a AES.Bb.MB y AES.Met.GC como las más eficaces en esta primera fase, por presentar menor TL₅₀ y mayor mortalidad acumulada al día ocho.

Las cepas seleccionadas, AES.Bb.MB y AES.Met.GC, fueron aisladas de hospederos de Homoptera y de Coleoptera respectivamente. Gutiérrez y colaboradores (2003) evaluaron sobre ninfas del quinto estadio de *Rhodnius pallescens* dos cepas (*B. bassiana*) aisladas de la misma especie triatomina y dos cepas (*B. brongniartii*) aisladas de *Homalinotous validus* (Coleoptera: Curculionidae), y reportaron mayor susceptibilidad a una de las cepas aisladas del curculiónido. Lecuona y colaboradores (2001) obtuvieron resultados similares con cepas de *B. bassiana* aisladas de Lepidoptera y Hemiptera; hacen hincapié que la especificidad huésped-patógeno no es estricta. Lo cual es opuesto a lo observado por Romaña y Fargues (1992) sobre otro triatomino (*R. prolixus*), en donde solamente las cepas que fueron aisladas de Hemiptera fueron altamente patogénicas.

8.2. Segunda Fase: Efecto de las cepas seleccionadas sobre los estados de desarrollo de *T. dimidiata*

En la segunda fase del estudio se demostró que las cepas *B. bassiana* AES.Bb.MB y *M. anisopliae* AES.Met.GC, tienen la habilidad de infectar los distintos estados de desarrollo del vector. En relación a los huevecillos, las cepas seleccionadas fueron patogénicamente eficaces a partir de la concentración más baja, 2×10^5 , por lo que se inhibió la eclosión y consecuente muerte del embrión, al confirmar la muerte por micosis.

Se ha manejado como regla que todos los estados de desarrollo son susceptibles a los insecticidas a excepción de los huevecillos (Noireau *et al.* 2005). Quizá a esto se deba que la información acerca de pruebas de susceptibilidad sobre huevecillos de triatominos con diferentes agentes tanto químicos como biológicos sea escasa. En Suramérica a pesar del amplio historial del uso de insecticidas para el control vectorial de la enfermedad de Chagas, solamente se han documentado

algunas pruebas de susceptibilidad sobre este estado de desarrollo. Toloza y colaboradores (2008) fueron más allá al realizar un estudio para determinar el patrón de resistencia en huevecillos y ninfas del primer estadio de *T. infestans*, en poblaciones de Argentina y Bolivia que han mostrado una alta resistencia a insecticidas. Sus resultados indican que la expresión de la resistencia a los insecticidas en huevecillos varía entre poblaciones, y que la resistencia a piretroides en ninfas del primer estadio de *T. infestans* no es un indicador de resistencia en huevecillos. Además señalan el hecho de que la resistencia a insecticidas en embriones no debe ser subestimada como una causa que contribuye a los fracasos en control.

Parra-Henao y colaboradores (2007) realizaron bioensayos para evaluar la actividad insecticida de cuatro extractos vegetales de cuatro diferentes especies sobre *R. prolixus* y *R. pallescens*, en el cual únicamente alcanzaron hasta un 25% de inhibición de la eclosión a altas concentraciones. Las CL₅₀ obtenidas son seis veces mayores a las recomendadas por la Agencia de Cooperación Técnica Alemana (GTZ). Concluyeron que los resultados son poco promisorios considerando que la eclosión natural de las especies estudiadas es de 85% bajo condiciones de laboratorio. Similares porcentajes de inhibición de la eclosión se obtuvo con la cepa de *B. bassiana* (AES.Bb.MB) utilizada en el presente estudio, en las concentraciones más bajas, 2×10^5 y 2×10^6 conidios /ml, la cual mostró menos virulencia que la cepa de *M. anisopliae* (AES.Met.GC), esta última significativamente más efectiva ($p=0.0001$) en las mismas concentraciones.

El control biológico, a través del uso del microhimenóptero *Telenomus fariai*, insecto que parasita huevecillos de triatominos fue evaluado en Guatemala por Enríquez (2001). Los resultados fueron promisorios ya que el parasitoide demostró un amplio rango de edad de los huevecillos parasitados de *T. dimidiata*; no obstante, el número de huevecillos parasitados disminuyó con la madurez de los mismos. Se alcanzó hasta un 63% de parasitismo en los huevecillos de uno a cinco días de madurez. Esta capacidad ovicida es inferior a la mortalidad con las cepas evaluadas a la concentración estándar en la presente investigación. Tomando en consideración lo referido por Virla (2000) como una ventaja de los parasitoides oófilos la prevención de la eclosión, por ser un “factor clave” en la dinámica poblacional, esto puede aplicarse también para estas cepas de hongos

entomopatógenos. Además, los hongos en comparación con los parasitoides los aventajan por tener la capacidad de infectar todos los estados de desarrollo.

En las pruebas de susceptibilidad realizadas por Romaña y Fargues (1992) sobre huevecillos de *R. prolixus* con una cepa de *B. bassiana* las concentraciones 1×10^5 y 3×10^5 conidios/cm² causaron una alta mortalidad (72% y 90%), la cual fue hasta cuatro veces mayor que la mortalidad obtenida en el presente estudio sobre el mismo estado de desarrollo de *T. dimidiata* con la cepa de *B. bassiana*, en la concentración 2×10^5 conidios/ml y similar mortalidad con la cepa de *M. anisopliae* a la misma concentración.

Lecuona y colaboradores (2001) realizaron pruebas preliminares a una concentración más elevada (1×10^8 conidios/ml) que las utilizadas en el presente estudio con una cepa de *B. bassiana* seleccionada por su eficacia sobre ninfas y adultos de *T. infestans*; sin embargo, observaron que la cepa no fue patogénica para el estado de huevecillo y solamente se logró una micosis secundaria al 100% de las ninfas emergidas de los huevecillos inoculados. Este comportamiento, micosis secundaria en ninfas emergidas, fue registrado en el presente estudio, en las concentraciones 2×10^5 de *M. anisopliae* y de *B. bassiana* en 1×10^7 y 2×10^7 (conidios/ml); con menor intensidad en esta última a pesar de ser concentraciones más altas. Si bien la intensidad de la micosis secundaria fue menor pese a las altas concentraciones, lo remarcable en este caso es que ambas cepas mostraron capacidad ovicida.

A diferencia de lo reportado con agentes químicos, Fuxa & Tanada (1987) indican que todos los estados de desarrollo de los insectos generalmente son susceptibles a la micosis; siendo los huevecillos los menos susceptibles a través del tiempo. Esto fue comprobado durante el presente estudio: en los primeros huevecillos infectados, la micosis fue evidente hasta el día 11 después de la inoculación, mientras que en los demás estados de desarrollo la mortalidad con micosis confirmada se observó desde los primeros días. Aunque, de acuerdo a la respuesta en mortalidad a las concentraciones evaluadas, los huevecillos y las ninfas del tercer estadio no presentan diferencia significativa ($p > 0.05$) en susceptibilidad a la cepa AES.Bb.MB, de acuerdo a la concentración letal media (CL50) y noventa (CL90). La cepa AES.Met.GC fue más virulenta, la mortalidad acumulada

confirmada 30 días postinoculación fue muy alta en los tratamientos para establecer una relación lineal entre concentración y mortalidad.

Es muy probable que debido a los poros presentes y distribuidos en la superficie del corión (exocorion) en diferentes especies del género *Triatoma* (Araujo *et al.* 2005, Obara *et al.* 2007), además del opérculo permitan y faciliten la acción de los hongos entomopatógenos, por el modo de acción de éstos. Sin embargo, este estudio demostró la importancia de la virulencia de la cepa y la concentración de la misma ya que los huevecillos sometidos a inóculos de *B. bassiana* AES.Bb.MB, fueron menos susceptibles significativamente ($p=0.0001$) en las concentraciones más bajas permitiendo porcentajes altos de eclosión. A estas concentraciones la penetración del corión no fue eficiente posiblemente debido a las barreras físicas de éste. La cepa de *M. anisopliae* (AES.Met.GC) fue más virulenta sobre este estado de desarrollo. Es notable, que en todas las concentraciones provocó un alto porcentaje de mortalidad en huevecillos determinado por la baja emergencia y posterior sobrevivencia muy reducida de ninfas.

Es importante destacar que los hallazgos de este estudio confirman el alto potencial de los hongos entomopatógenos para el control de *T. dimidiata* para aplicar en sitios comunes de oviposición por su gran capacidad ovicida. Tomando en cuenta que los triatominos, a partir del primer estadio ninfal, se alimentan de sangre, los hongos entomopatógenos interrumpirían la transmisión en etapas tempranas de desarrollo del vector lo que constituye una particular herramienta estratégica en la prevención primaria. Esta contribución va más allá de trabajar solo con los otros estados de desarrollo del vector, que es el tipo de control tradicional. Además, se ha demostrado sobre una plaga agrícola, *Tetranychus evansi* (Acari, Tetranychidae), que cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* tienen la capacidad de reducir la oviposición en hembras infectadas (Wekesa *et al.* 2006).

La rapidez de acción de las cepas seleccionadas en el presente estudio se determinó a través de la comparación del tiempo necesario para matar al 50% (TL₅₀) de las ninfas del primer y tercer estadios expuestas. Las ninfas del primer estadio presentaron un TL₅₀ similar para ambas cepas, mientras que la cepa de *M. anisopliae* fue más eficaz con un TL₅₀ significativamente menor ($p<0.05$) a la cepa de *B. bassiana* sobre las ninfas del tercer estadio.

En relación a la susceptibilidad por estado/estadio de desarrollo, los resultados de Romaña & Fargues (1992) sugieren que la susceptibilidad de *R. prolixus* a la cepa utilizada de *B. bassiana* aumenta con el estadio. Esta respuesta proporcional estadio-susceptibilidad en el tiempo, fue muy reducida entre ninfas del primer estadio (N1) y ninfas del tercer estadio (N3), y de igual manera entre ninfas del quinto estadio (N5) y adultos. Mientras que los resultados sobre *T. dimidiata* con AES.Met.GC y AES.Bb.MB, las N1 presentaron un TL₅₀ significativamente menor ($p < 0.05$) a las N3 con estas dos cepas.

Los resultados observados sobre estos dos estadios ninfales de *T. dimidiata* se encuentran en correspondencia con las observaciones de Zeledón *et al.* (1970) en el estudio que realizaron sobre biología y etología de *T. dimidiata*. En el cual demostraron que la habilidad de sobrevivencia a la inanición aumenta con el estadio de la ninfa, especialmente después de una “comida”. El promedio de vida bajo condiciones de inanición de los estadios ninfales primero y tercero son de 30 días y 81 días respectivamente (Zeledón *et al.* 1970). Por lo que los TL₅₀ obtenidos con las cepas seleccionadas sobre N1 y N3 se debe muy probablemente a que existe una asociación entre la susceptibilidad y el estadio ninfal en correspondencia con la expectativa de vida.

Debido a que las N1 no fueron evaluadas a cuatro concentraciones no se usaron en el estudio de regresión logística para la estimación del riesgo, según el estadio de desarrollo controlando por la concentración a los 15 días postinoculación. En los resultados de la regresión logística para los estadios y estado restantes, no se estableció diferencia en relación a la susceptibilidad entre ninfas del tercer (N3) y el quinto estadio (N5); ni entre el estado adulto y ninfas del quinto estadio (N5), tanto para *B. bassiana* como para *M. anisopliae*. Sin embargo, los adultos fueron más susceptibles que las N3 con una marcada diferencia entre las dos cepas. Para la cepa de *Metarhizium* en al menos 50% y para la cepa de *Beauveria* en al menos 130% más altas las posibilidades de muerte de los adultos que para N3.

Los resultados coinciden en parte con los obtenidos sobre *R. prolixus* por Romaña y Fargues (1992), quienes reportaron que las ninfas del tercer estadio fueron 50 veces menos susceptibles que los adultos y ninfas del quinto, a los seis días postinoculación. Mientras Lecuona y colaboradores

(2001), aunque obtuvieron diferencias entre las cepas de *B. bassiana* utilizadas, no las tuvieron entre N3 y adultos de *T. infestans*.

Cuando se realizaron los bioensayos del presente estudio, la edad de los adultos no pudo ser estimada porque la mayoría fueron colectados en campo. No obstante, este factor no se considera determinante debido a que en condiciones de inanición o ayuno presentan poca diferencia en el promedio de vida reportado para *T. dimidiata* entre ninfas del tercer estadio y adultos, 81 y 73 días respectivamente. Las ninfas del quinto estadio presentan bajo esta condición (ayuno) la mayor resistencia, 119 días de vida promedio (Zeledón *et al*, 1970). Por lo tanto, no se observó la existencia de una asociación entre la resistencia del estado de desarrollo en condiciones de inanición y la resistencia al entomopatógeno.

Como se ha reportado, los diferentes estados de desarrollo reaccionan o responden en distintos grados de susceptibilidad. Ferron (citado por Romaña y Fargues 1992) señala que en función del estadio, la susceptibilidad del hospedero depende de la especie hospedera y de la cepa del hongo. Algunas especies son menos susceptibles en los estadios más viejos; mientras otras aumentan la susceptibilidad con la edad o madurez.

En este estudio, la determinación de la concentración para matar al 50% y 90% de la población expuesta de *T. dimidiata*, se hizo en dos grupos. En el primer grupo se calcularon ambas concentraciones a los 30 días postinoculación en huevecillos y ninfas del tercer estadio y no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre estos estados de desarrollo; sin embargo, en la CL_{90} se obtuvieron límites de confianza amplios, lo que indica poca precisión en el caso de la cepa de *B. bassiana*. Mientras que la cepa de *M. anisopliae* presentó una alta mortalidad acumulada y confirmada a los 30 días después de la inoculación, lo que no permitió establecer una relación lineal entre concentración y mortalidad.

En el segundo grupo, N3, N5 y adultos, se calculó la concentración letal media a los siete y 10 días después de la inoculación. La CL_{50} de AES.Bb.MB (*B. bassiana*) calculada a los 10 días sobre N3, fue significativamente la más alta ($p < 0.05$) entre cepas y entre estadios, con un intervalo de

confianza bastante impreciso. Además, solo esta CL_{50} se pudo determinar con esta cepa, ya que en los demás estadios, tanto al día siete con al día 10, la mortalidad acumulada fue menor al 50%, lo que no permitió obtener el valor de la CL_{50} . Esto obedece a la falta de previsión para determinar un mayor número de concentraciones (se usaron cuatro concentraciones) para poder establecer una relación lineal aceptable entre la concentración y la mortalidad, ya que para ello se necesitan por lo menos cinco concentraciones. Debíó haberse tomado la concentración estándar (1×10^7 conidios/ml) utilizada en la primera parte de los bioensayos como la mayor concentración, porque ésta fue suficiente para matar al 100% de N1 expuestas en los tratamientos con las seis cepas. Además de usar esta concentración se debió usar cuatro concentraciones más bajas. La falta de repeticiones en ninfas del quinto estadio y adultos, sin duda influyó también en estos resultados. A pesar de estas limitantes, los resultados sugieren que se necesita una menor cantidad de inóculo de *M. anisopliae* que de *B. bassiana* para matar al 50% de la población de huevecillos, N3, N5 y adultos

La mortalidad de *T. dimidiata* en general aumentó con la concentración de las cepas evaluadas. No obstante sobre N5 y adultos, las altas concentraciones (10^7) causaron una respuesta atípica en la mortalidad acumulada a los 15 días después de la inoculación. La concentración más alta (2×10^7) presentó una menor agresividad a través del tiempo, debido a que para ambas cepas los inóculos con esta concentración alcanzaron hasta los 30 días alrededor del 100% de mortalidad sobre N5 y adultos. Romaña y Fargues (1992) obtuvieron resultados similares con concentraciones del mismo exponente sobre N3 y N5 de *R. prolixus*. También Luz y colaboradores (1999) reportaron este tipo de observación en la cual a la mayor concentración la mortalidad de *T. infestans* fue menor, además de iniciarse de forma tardía en comparación con una concentración más baja. Diferentes autores argumentan que este comportamiento se debe a una autoinhibición de la germinación producida por compuestos liberados por los conidios no germinados a altas concentraciones (Luz et al. 1999, López-Llorca & Carbonell 1999, Chitara et al. 2004). Sin desestimar la falta de réplicas en el presente caso para *T. dimidiata*.

En las pruebas de independencia condicional, controlando por el estado y estadio de desarrollo, realizadas para confirmar estadísticamente una asociación concentración-mortalidad; se demostró que la posibilidad de muerte o susceptibilidad de una chinche aumenta al incrementar la

concentración. La mayor diferencia de susceptibilidad de una chinche se observó entre la concentración más baja (2×10^5 conidias/ml) y las más altas (1×10^7 y 2×10^7), la posibilidad de muerte fue menor con la cepa AES.Bb.MB que con la cepa AES.Met.GC. Para la cepa AES.Bb.MB (*B.bassiana*) fue necesario excluir los resultados de mortalidad en ninfas del quinto estadio a la concentración más alta (2×10^7 conidios/ml), por ser marcadamente atípicos como se discutió anteriormente.

Comparando los resultados sobre N5 y adultos, con los resultados sobre huevecillos tratados con AES.Bb.MB y AES.Met.GC se converge con la conclusión a la que llegaron Fuentes y Carballo (1995). Ellos obtuvieron altos porcentajes de mortalidad que no difieren sobre un lepidóptero, *Plutella xylostella*, con concentraciones 10^7 y 10^8 conidias/ml; demostrando que era innecesario aumentar la dosis para obtener una mortalidad efectiva. Por lo que se considera suficiente la concentración 1×10^7 para causar una alta mortalidad del triatomino.

Al comparar los porcentajes de mortalidad dentro de las distintas concentraciones mediante la prueba de diferencia de proporciones (Z), se determinó que la cepa AES.Met.GC *M. anisopliae* causó mayor porcentaje de mortalidad y fue más eficaz sobre huevecillos, ninfas del tercer estadio, ninfas del quinto estadio y adultos.

9. CONCLUSIONES

- 9.1. Las cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* evaluadas demostraron ser patogénicas sobre *T. dimidiata*, a excepción de la cepa AES.Met.MB (*M. anisopliae*) aislada de mosca blanca (Homoptera: Aleyrodidae), filogenéticamente relacionada a los hemípteros. Las otras seis cepas presentaron una alta mortalidad confirmada acumulada sin diferencias significativas entre sí ($p=0.99$).
- 9.2. No se pudo demostrar la existencia de una relación entre el hospedero del aislamiento de origen de la cepa y la patogenicidad, o sea, una especificidad huésped-hospedero.
- 9.3. Se confirmó la validez y correspondencia de valores obtenidos a través de los métodos para estimar el tiempo necesario para matar al 50% de la población expuesta (TL_{50}). Tanto el análisis Probit como la interpolación gráfica lineal se correspondieron a juzgar por la inclusión del valor obtenido por interpolación gráfica en el intervalo de confianza al 95% del modelo probit.
- 9.4. Para las pruebas de susceptibilidad realizadas sobre huevecillos, ninfas de tercero y quinto estadios, y adultos; se seleccionó a AES.Bb.MB de *B. bassiana* y AES.Met.GC de *M. anisopliae* debido a que mataron en el menor tiempo al 50% de la población expuesta de ninfas de primer estadio.
- 9.5. Se inhibió la eclosión de huevecillos a partir de la concentración más baja, 2×10^5 para ambas cepas. Sin embargo, AES.Met.GC fue significativamente más efectiva en las concentraciones 2×10^5 ($p=0.0001$) y 2×10^6 ($p=0.0001$) conidios/ml.
- 9.6. Se determinó que los adultos son más susceptibles que las ninfas del tercer estadio ($p=0.0014$ *B. bassiana*, $p=0.0053$ *M. anisopliae*), independientemente de la concentración. No obstante, no se determinó diferencia significativa entre adultos y ninfas del quinto estadio.

- 9.7.** Una de las posibles causas de la respuesta atípica a la mayor concentración puede ser la autoinhibición de la germinación; sin embargo, no se desestima el hecho de la falta de repeticiones para las ninfas del quinto estadio y adultos
- 9.8.** Existe asociación entre las posibilidades de muerte y la concentración ($p < 0.0001$). Por lo tanto, en este estudio se determinó una relación dosis-mortalidad.
- 9.9.** Se demostró que los hongos entomopatógenos son una alternativa para en la prevención primaria al interrumpir el ciclo de vida del vector de manera temprana, debido a que las cepas evaluadas mostraron ser muy eficaces sobre huevecillos de *T. dimidiata*.

10. RECOMENDACIONES

- 10.1. Para demostrar la eficacia de los hongos es recomendable realizar pruebas de susceptibilidad por métodos indirectos.
- 10.2. Como en formulaciones agrícolas deben probarse formulaciones que se adapten más a las condiciones ambientales una vez se logre su estabilidad en ambientes difíciles.
- 10.3. Evaluar la capacidad de los hongos de disminución en la oviposición lo que se ha demostrado en insecticidas químicos a dosis bajas.
- 10.4. Continuar la búsqueda de cepas nativas de hongos entomopatógenos aislados de triatominos.

11. REFERENCIAS

1. Aleán, I. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus sicalis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Básicas, Microbiología Agrícola y Veterinaria). 107 p. [citado mayo, 2004] <http://www.ciat.cgiar.org/ipm/pdfs/tesis_irina_alean.pdf>
2. Al Mazra'awi, M. 2007. Impact of the Entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on the honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). World J. Agric. Sci. 3(1): 07-11.
3. Alves, SB. 1986. Controle microbiano de insetos. Ed. Manole, Brasil. 407 p.
4. Araújo, M., Jurberg, J., Santos, H., Da Silva, D., Carcavallo, R. & Galvão, C. 2005. Morfologia comparada dos ovos e ninfas de *Triatoma vanda* Carcavallo, Jurberg, Rocha, Galvão, Noireau & Lent, 2002 e *Triatoma williami* Galvão, Souza & Lima, 1965 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 100(6): 649-661.
5. Barnett, H. & Hunter, B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th Ed. The American Phytopathological Society Press. USA. 218 p.
6. Barrientos, L. 2002. Uso de hongos entomopatógenos en el control de plagas en campo; comercialización, uso actual y futuro de hongos entomopatógenos. Instituto Tecnológico de Cd. Victoria. Memorias Curso Internacional de Patología de Insectos, Cd. Victoria, Tamaulipas, México.
7. Benitez, L. 2008. Efectividad insecticida de dos formulaciones de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin aplicadas en adobe infestado con *Triatoma dimidiata* (Latrielle), vector de la enfermedad de Chagas. Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 65 p.
8. Carcavallo, R., Jurberg, J., Lent, H., Noireau, F. & Galvão, C. 2000. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) proposals for taxonomic arrangements. Editor Jurberg. Entomología y Vectores, Rio de Janeiro, 7 (1): 1-99.
9. Cecere, M., Gürtler, R., Canale, D., Chuit, R. & Cohen, J. 2002. Effects of partial housing improvement and insecticide spraying on the reinfestation dynamics of *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. Acta Tropica 84: 101-116.
10. Chitarra, G., Abee, T., Rombouts, F., Posthumus, M. & Dijksterhuis, J. 2004. Germination of *Penicillium paneum* conidia is regulated by 1-octen-3-ol, a volatile self-inhibitor. Appl. Environ. Microbiol. 70(5): 2823-2829.

11. Cruz, D. 1997. Caracterización de diez cepas de *Trypanosoma cruzi* por curvas de crecimiento en cultivo *in vitro*. Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 54 p.
12. DeBach, P. 1964. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Trad. Castañón. C.E.C.S.A. México. 949 p.
13. De León, M. 1997. Estudio clínico, serológico y epidemiológico de la enfermedad de Chagas en Santa María Ixhuatán, Santa Rosa. Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 72 p.
14. Devotto, L., Gerding, & France, M. 2000. Hongos entomopatógenos. Boletín Informativo Agropecuario. Ministerio de Agricultura, Gob. de Chile. [citado mayo, 2004] <<http://www.inia.cl/cobertura/quilamapu/pubbycom/bioleche/boletin2000/BOLETIN23.html>>
15. Dujardin, J., Panzera, F. & Schofield, C. 2000. Triatominae as models for understanding basic evolutionary processes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 95(2).
16. Dumonteil, E., Ruiz-Piña, H., Rodríguez-Félix, E., Barrera-Pérez, M., Ramírez-Sierra, M., Rabinovich, J. & Menu, F. 2004. Re-infestation of houses by *Triatoma dimidiata* after intradomicile insecticide application in the Yucatán Peninsula, Mexico. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99(3): 253-256.
17. Enríquez, E. 2000. Evaluación de la eficacia de *Telenomus fariai rabinovichi* (Hymenoptera: Scelionidae) como enemigo natural a nivel de huevos de *Triatoma dimidiata*, principal vector del Mal de Chagas en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 50 p.
18. Estrada, R. 2003. Comunicación personal. Agrícola El Sol. Guatemala.
19. Fuxa, J.R. and Tanada, Y. 1987. Epizootiology of Insect Diseases. Wiley Interscience Publ., NY 555 p.
20. Guhl F. & Jaramillo C. 2002. Memorias Curso Taller Internacional - Sistemas de Información Geográfica, Sensores Remotos y Genética Poblacional de Vectores y Parásitos Aplicados al Control de la Enfermedad de Chagas. Universidad de los Andes. Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical –CIMPAT-. Colombia. 226 p.
21. Guhl F. & Schofield C. 2000. Memorias Cuarto Taller Internacional sobre Genética Poblacional y Control de Triatomíneos. Universidad de los Andes. Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical –CIMPAT-. Colombia. 194 p.

22. Gürtler, R., Canale, D., Spillmann, C., Stariolo, R., Salomón, O., Blanco, S. & Segura, E. 2004. Effectiveness of residual spraying of peridomestic ecotopes with deltamethrin and permethrin on *Triatoma infestans* in rural western Argentina: a district-wide randomized trial. World Health Organization 82(3): 196-205.
23. Gürtler R E; Cecere M C; Canale D M; Castañera M B; Chuit R; Cohen J E. 1999. Monitoring house reinfestation by vectors of Chagas disease: a comparative trial of detection methods during a four-year follow-up. Acta tropica 72(2):213-34.
24. Gürtler RE, Petersen RM, Cecere MC, Schweigmann NJ, Chuit R, Gualtieri JM & Wisnivesky-Colli C, 1994. Chagas disease in north-west Argentina: risk of domestic reinfestation by *Triatoma infestans* after a single community-wide application of deltamethrinl Trans Roy Soc Trop Mcd Hyg. 88: 27-30.
25. Gutiérrez, F., Saldarriaga, Y., Calle, J. & Uribe, S. 2003. Susceptibility of *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae) of fifth instar nymph to the action of *Beauveria* spp. Entomotropica, 18(3): 163-168.
26. Hajek, A. and St. Leger, R. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annu. Rev. Entomol. 39: 293-322.
27. Hashimoto, K., Cordon-Rosales, C., Trampe, R. and Kawabata, M. 2006. Impact of single and multiple residual spraying of pyrethroid insecticidas against *Triatoma dimidiata* (Reduviade: Triatominae) the principal vector of Chagas Disease in Jutiapa, Guatemala. Am. J. Trop. Med. Hyg. 75(2): 226-230.
28. Hernández-Velásquez, V., Berlanga-Padilla, A. & Barrientos-Lozano, L. 2000. Vegetable and mineral oil formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* to control the Central American Locust (*Schistocerca piceifrons piceifrons* Walter) (Orthoptera: Acridae). J. Orthoptera Res. 9: 223-227.
29. Lent, H. & P. Wygodzinsky. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. Bull. Am. Mus. Nat. Hist 163:125–520.
30. Lecuona E., Edelstein J., Barretta M., La Rossa F. & Arcas J. 2001. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) strians as potential agents for control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). J. Med. Entomol. Vol. 38 (2): 172-179.
31. Lord, J. 2001. Desiccant dust synergize the effect of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) on stored-grain beetles. J. Econ. Entomol. 94(2): 367-372.
32. Luna, J. & Leucona, R. 2000. Selección de cepas de hongos entomopatógenos nativos para el Control de la tucura *Rhammatocerus pictus* (Bruner) (Orthoptera: Acrididae). . R.I.A. INTA 31 (1): 67-84.

33. Luz, C., Tigano, M., Silva, I., Cordeiro, C. & Aljanabi, S. 1998. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 93(6): 839-846.
34. Luz C., Silva I., Magalhaes B. Cordeiro C., & Tigano M. 1999. Control of *Triatoma infestans* (Klug) (Reduviidae: Triatominae) with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.: preliminary assays on formulation and application in the field. An. Soc. Entomol. 28 (1): 101-110.
35. Luz, C., Rocha, L., Nery, G., Magalhães, B & Tigano, M. 2004. Activity of oil-formulated *Beauveria bassiana* against *Triatoma sordida* in peridomestic areas in central Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99(2): 212-218.
36. Melgar, S., Chávez, J., Landaverde, P., Herrera, F., Rodas, A., Enríquez, E. Dorn, P. and Monroy, C. 2004. The number of families of *Triatoma dimidiata* in a Guatemalan house. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99: 1-3.
37. Monroy, C., Rodas, A., Mejía, M. and Tabaru, Y. 1998. Wall plastering and paints as methods to control vectors of Chagas disease in Guatemala. Med. Entomol. Zool. 49(3): 187-193.
38. Monroy C., 2004. Comunicación personal. Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología – LENAP- Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC. Guatemala.
39. Monroy, M. C. 2003. Ecology and Control of Triatomine (Hemiptera: Reduviidae) Vectors of Chagas Disease in Guatemala, Central America. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 895. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. 22p.
40. Monroy, C., Bustamente, D. M., Rodas, A., Rosales, R. and Enríquez, E. 2003. Habitats, dispersion and invasion of sylvatic *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Petén, Guatemala. J. Med. Entomol. 40 (6): 115-119.
41. MSPAS/OPS. 2005. Manual de diagnóstico y atención para la enfermedad de Chagas. Guatemala. 19 p.
42. Nakagawa J., Cordón-Rosales C., Juárez J., Itzep C. & Nonami T. 2003a. Impact of residual spraying on *Rhodnius prolixus* and *Triatoma dimidiata* in the department of Zacapa in Guatemala. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98(2): 277-281.
43. Nakagawa J., Hashimoto K., Cordón-Rosales C., Juárez J., Trampe R. & Marroquín L. 2003b. Impact of vector control in *Triatoma dimidiata* in the department of Jutiapa in Guatemala. Ann. of Tropical Med. and Parasitology. 97(3): 3, 000–000.
44. Noireau, F., Carbajal-de-la-Fuente, A., Lopes, C. & Diotaiuti, L. 2005. Some considerations about the ecology of Triatominae. An Acad Bras Cienc. 77(3):431-436.

45. Obara, M., João, Silva, R., Nilza, N., Ceretti, Jr. W., Urbinatti, Paulo R., Barata, J. *et al.* 2007. Estudio morfológico e histológico dos ovos de seis espécies do gênero *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae). *Neotrop. entomol.* [citado febrero, 2009]; 36(5): 798-806. <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2007000500023&lng=en. doi: 10.1590/S1519-566X2007000500023.
46. Oliveira, A. 1997. Uso de nuevas herramientas para el control de triatomíneos en diferentes situaciones entomológicas en el continente americano. *Rev. Soc. Brasileira Med. Tropical* 30:41-46.
47. [OPS] Organización Panamericana de la Salud. 2002a. Taller para el establecimiento de pautas técnicas en el control de *Triatoma dimidiata*. Iniciativa de Centroamérica y Belice para la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas por *Rhodnius prolixus*, disminución de la infestación intradomiciliaria por *Triatoma dimidiata* y la eliminación de la transmisión transfusional de *Trypanosoma cruzi*. Memorias, 11-13 de marzo de 2002. San Salvador, El Salvador. OPS/HCP/HCT/214/02
48. [OPS] Organización Panamericana de la Salud. 2002b. Cuarta Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa de Centroamérica y Belice para la Interrupción de la Transmisión de la Enfermedad de Chagas. Washington DC. OPS/HCP/HCT/202/02.
49. Parra-Henao, G., Garcia, P. & Cotes, T. 2007. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reuviidae). *Boletín de Malariología y Salud. Ambiental*, 47(1):125-137.
50. Poinar, G. & Thomas, G. 1984. *Laboratory guide to insect pathogens and parasites*. Plenum Press. U.S.A. 392 p.
51. Prescott, L., Harley, J. & Keim, D. 1999. *Microbiología*. Trad. Agud *et al.* McGraw-Hill Interamericana. 4ª ed. 1005 p.
52. Romaña C. & Fargues J. 1992. Relative susceptibility of different stages of *Rhodnius prolixus* to the entomopathogenic hyphomycete *Bauveria bassiana*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87 (3): 363-368.
53. Rosas, J. 2002. Hongos entomopatógenos. Universidad Autónoma de Guerrero. Memorias Curso Internacional de Patología de Insectos, Cd. Victoria, Tamaulipas, México.
54. Schofield C. J. 1994. *Triatominae; Biología y control*. Tims & Schofield, Trad. USA. Eurocomunica Publications. 80p.
55. Secretaría de Salud, Subsecretaría de Servicios de Salud / OPS. 1996. *Entomología, con énfasis en el control de vectores*. Vol. II, México. 688 p.

56. Tabaru Y. 1995. Métodos de prevención de la enfermedad de Chagas. No publicado.
57. Tabaru, Y., Monroy, C., Rodas, A., Mejía, M. & Rosales, R. 1999. The geographical distribution of vectors of Chagas' disease and populations at risk of infection in Guatemala. *Med. Entomol. Zool.* 50 (1): 9-17.
58. Toloza, A., Germano, M., Cueto, G., Vassena, C., Zerba, E. & Picollo, M. 2008. Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first instars of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J. Med. Entomol.* 45(3):421-426.
59. Toriello, C., Navarro-Barranco, H., Almengor, M. & Mier, T. 1999. Aplicación de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin como bioinsecticida contra la mosca pinta (Homoptera: Cercopidae) en pastizales para ganado en Guatemala. *Rev. Mex. Micol.* 15: 119-121.
60. Villa, L., Escribá, J.M. y Parreño, F. 2005. Resultados de tratamientos de la enfermedad de Chagas en menores de 15 años en el proyecto de Médicos Sin Fronteras en Tarija (Bolivia). *Rev. Pediatr. Aten. Primaria* 7 (1): 61-76.
61. Virla, E. 2000. Aportes al conocimiento del complejo de enemigos naturales de *Exitianus obscurinervis* (Insecta- Cicadellidae). *Bol. San. Veg. Plagas* 26: 365-375.
62. Wekesa, V., Knapp, M., Maniania, N. & Boga, H. 2006. Effects of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on mortality, fecundity and egg fertility of *Tetranychus evansi*. *J. Appl. Entomol.* 130(3): 155-159.
63. [WHO] World Health Organization. 2008. Position statement on integrated vector management. *Weekly epid. record* 83(20): 177-181.
64. Zeledón, R. 1981. El *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) y su relación con la enfermedad de Chagas. Editorial Universidad Estatal a Distancia. Costa Rica 146 p.
65. Zeledón, R. 1983. Vectores de la enfermedad de Chagas y sus características ecofisiológicas. *Interciencia* 8 (6): 384-394.
66. Zeledón, R., Ugalde, J. & Paniagua, L. 2001. Entomological and ecological aspects of six sylvatic species of Triatomines (Hemiptera: Reduviidae) from the collection of the National Biodiversity Institute of Costa Rica, Central America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96: 757-764.
67. Zerba, E. 1999. Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas Disease vectors. Simposio Internacional. Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires. 59 (Supl II): 41-46.

ANEXOS

ANEXO 1

Procedimiento durante los bioensayos.

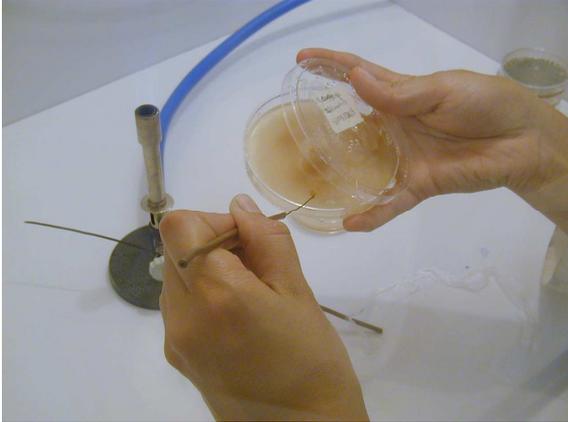


Fig. 1. Siembra para producción masiva de las diferentes cepas.



Fig. 2. Campana de flujo laminar con equipo utilizado para la preparación de inóculos a diferentes concentraciones.



Fig. 3. Obtención de inóculos.



Fig. 4. Selección de insectos en buen estado, con apariencia saludable para bioensayos.



Fig. 5. Inoculación de la solución fúngica por inmersión.



Fig. 6. Viales con biombos de papel filtro en los que se mantuvieron las chinches post-inoculación.



Fig. 7. Bandeja con viales conteniendo a las chinches, después de tratamiento.



Fig. 8. Cámara húmeda para favorecer la esporulación, postmortem.

ANEXO 2

Micosis causada por inoculación de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre estados de desarrollo de *T. dimidiata*.



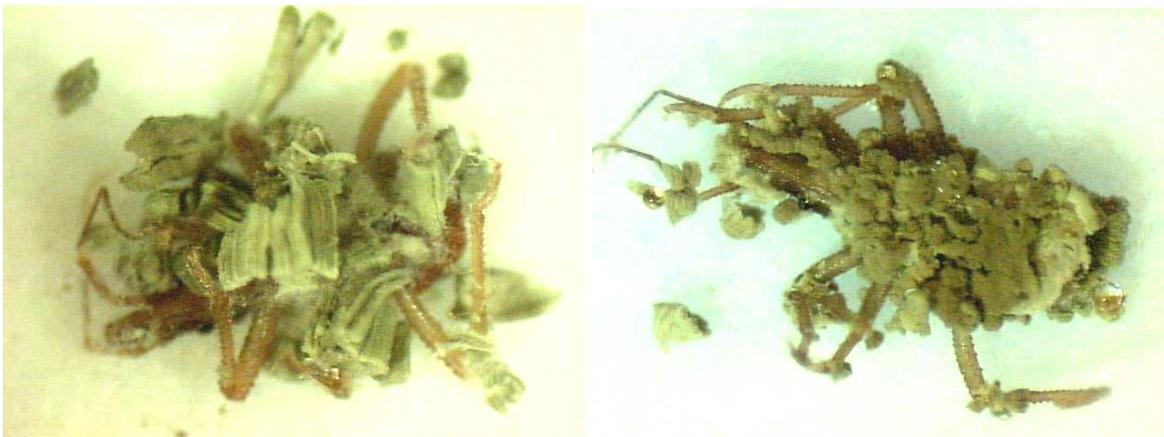
Fig. 1. Huevecillos de *T. dimidiata* infectados con *B. bassiana*.



Fig. 2. Huevecillos de *T. dimidiata* infectados con *M. anisopliae*.



Figs. 3,4 y 5. *Triatoma dimidiata* adulto y ninfas en proceso de esporulación con *B. bassiana*, éste se evidencia primero en las suturas de articulaciones.



Figs. 6 y 7. Esporulaci3n sobre ninfas del primer estadio con dos cepas diferentes de *M. anisopliae*.

Sayra Beatriz Chanquin Avendaño
Tesisista

Licda. María Eunice Enríquez Cotton
Asesora

Licda. Antonieta Guadalupe Rodas Retana
Revisora

Licda. Ana Rosalito Barrios de Rodas
Directora de Escuela

Lic. Oscar Manuel Cobar Pinto, PhD.
Decano de la Facultad