



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE PARASITOLOGÍA Y VECTORES

“Determinación del efecto de *Bacillus thuringiensis*
(Bacillales: Bacillaceae) sobre *Aedes aegypti* (Díptera:
Culicidae) en condiciones de laboratorio y evaluación
de Bactivec® sobre otras especies de culícidos en
condiciones de campo”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

IMELDA GORGONIO HERNÁNDEZ

DIRECTOR

DR. JOSÉ LINO ZUMAQUERO RÍOS

H. Puebla de Zaragoza, agosto 2016



AGRADECIMIENTOS

A la Escuela de Biología y a todos sus académicos y administrativos, que me dieron la oportunidad de superarme tanto personal como profesionalmente.

Al Doctor José Lino Zumaquero Ríos, por el apoyo durante estos tres años de trabajo en el Laboratorio de Parasitología y Vectores, así como al asesoramiento incondicional de mi investigación.

A la maestra Javiera Estefany Barrientos Gutiérrez, por el apoyo y orientación en el análisis estadístico de este trabajo, por su amabilidad y consejos.

Al biólogo Raúl Rojas García, por su asesoramiento.

A mi compañero de laboratorio Diego Argüelles Palomino, por su apoyo incondicional en el desarrollo de este trabajo, por su constante motivación y ánimo en los momentos difíciles.

DEDICATORIA

A Dios que me dio la vida y permitirme llegar a este momento especial de mi vida.

A mi padre Hugo Gorgonio Reyes, por sus consejos que me ayudaron a tomar las decisiones correctas, porque su esfuerzo ha hecho que no me falte nada y por el apoyo incondicional, durante mi preparación profesional.

A mi madre Micaela Hernández Hernández, por sus consejos y constante motivación en los tiempos difíciles durante mi preparación profesional.

A mi hermano Hugo, que me contagia de su alegría, ánimo y su constante curiosidad por la vida.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN
 - 1.1. Prevención y control de vectores
 - 1.2. La familia Culicidae
 - Morfología de *Aedes aegypti*
 - Ciclo de vida de *Aedes aegypti*
 - Culícidos de importancia médico-veterinaria
 - 1.3. Control biológico con el uso de *Bacillus thuringiensis*
 - Alcalización de fluidos del intestino medio
 - Mecanismo de acción
2. ANTECEDENTES
 - 2.1. Control enfocado a *Aedes aegypti*
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
4. HIPÓTESIS
5. OBJETIVOS
 - 5.1. Objetivo general
 - 5.2. Objetivos particulares
6. MATERIAL Y MÉTODOS
 - 6.1. Determinar el efecto de seis cepas de *B. thuringiensis* en larvas de los cuatro estadios de *Ae. aegypti*, en condiciones de laboratorio
 - Obtención de cepas de *Bacillus thuringiensis*
 - Cría y mantenimiento de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller
 - Bioensayo
 - Análisis de datos
 - 6.2. Evaluar el producto Bactivec® sobre especies urbanas, en criaderos dentro del área de Ciudad Universitaria
 - Distribución y caracterización de criaderos
 - Análisis de datos
7. RESULTADOS
 - 7.1. Determinar el efecto de seis cepas de *B. thuringiensis* en larvas de los cuatro estadios de *Ae. aegypti*, en condiciones de laboratorio

7.2. Evaluar el producto Bactivec® sobre especies urbanas, en criaderos dentro del área de Ciudad Universitaria

- Distribución y caracterización de criaderos

8. DISCUSIÓN

8.1. Ensayo en laboratorio

8.2. Ensayo en campo

9. CONCLUSIONES

10. BIBLIOGRAFÍA

RESUMEN

La incidencia de las enfermedades transmitidas por vectores ha incrementado en los últimos años. La familia Culicidae consta de numerosos géneros y especies descritas, los mosquitos son los transmisores o vectores de las enfermedades arbovirales más importantes que afectan a los mamíferos. En el control de poblaciones se usan insecticidas químicos que dejan efectos residuales, provocando daños al medio ambiente y alteraciones considerables de salud a la población humana, además los mosquitos han desarrollado resistencia a este tipo de insecticidas; por lo que el desarrollo y uso de insecticidas por antagonistas biológicos es una alternativa en el control de mosquitos. *Bacillus thuringiensis* es una bacteria cuyas δ -endotoxinas funcionan de manera eficaz controlando poblaciones de diversos insectos que afectan a la agricultura, la actividad forestal y a vectores de enfermedades, donde su blanco son las formas larvianas. El objetivo de este trabajo fue evaluar seis cepas de *B. thuringiensis* var. *israelensis*, como alternativa de control biológico en *Aedes aegypti* y Bactivec® sobre otras especies de culícidos en condiciones de laboratorio y campo, respectivamente. Se realizaron dos evaluaciones independientes; el primer ensayo consistió en evaluar los cristales de seis cepas aisladas de *B. thuringiensis* sobre larvas de mosquitos *Ae. aegypti* de los cuatro estadios larvales. Para cada estadio larval se utilizaron 10 larvas que fueron contenidas en vasos de plástico de 250 ml, incluyendo un grupo control, con tres repeticiones a las cuales se les administró una sola dosis de 0.06% de *B. thuringiensis*. Se contabilizó la mortalidad cada 12 horas hasta que murieran todas las larvas o pasaran del estado de pupa a estado imago. Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS versión 15.1. La otra evaluación se realizó dentro del área de Ciudad Universitaria, identificando los criaderos y caracterizando el tipo de cada uno, se midieron las propiedades físico-químicas del agua de los criaderos. Se estimó el índice de recipientes y la densidad relativa de cada criadero. Las larvas colectadas se determinaron hasta especie utilizando la metodología y claves de Ibáñez y Martínez (1994). Los resultados obtenidos de la prueba aplicada en la primera evaluación indicaron diferencias significativas entre las cepas evaluadas, destacando para la cepa 2 en los primeros dos estadios. En la segunda evaluación

se registraron 27 criaderos y más común fue tipo bajo-pozo. El uso de Bactivec® disminuyó la densidad larvaria de 60% hasta el 75% en las primeras 24 horas en los criaderos tratados. En los criaderos tratados se identificaron cinco especies: *Aedes epactius*, *Culex restuans*, *Cx. stigmatosoma*, *Cx. salinarius* y *Psorophora ciliata*.

1. INTRODUCCIÓN

La incidencia de las enfermedades transmitidas por vectores ha incrementado en los últimos años, siendo los organismos de la familia Culicidae los vectores de mayor importancia médica y veterinaria por transmitir enfermedades como: el Dengue, la Fiebre del Valle de Rift, la Fiebre amarilla, el Chikungunya, el Zika, la Malaria, la Encefalitis, la Filariasis, entre otras (Neglected tropical diseases, 2016). En su mayoría, estas constituyen enfermedades arbovirales y afectan a millones de personas en el mundo, por ejemplo, cada año más de 2500 millones de personas en más de 100 países están en riesgo de contraer dengue, debido a la inexistencia o déficit del control de poblaciones (OMS, 2016). En el control de las poblaciones de mosquitos, se resalta a *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), debido a que es vector de gran parte de las enfermedades ya mencionadas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) promueve programas de prevención y control, además alerta sobre los sitios donde se localiza una epidemia emergente o reemergente como es el caso actual de Angola y Uganda, África que presentan numerosos casos de Fiebre Amarilla; en el caso de México se han confirmado 201 casos de infección por el virus de Zika y los estados más afectados son Chiapas, Oaxaca (International Society for Infectious Diseases, 2016).

Para el control de dípteros vectores, a través de los años se han utilizado formulaciones químicas, que incluyen compuestos organofosforados, organoclorados, piretroides y carbamatos, los cuales contaminan seriamente los ecosistemas donde existen especies benéficas para el hombre (Badii y Varela, 2008), además las inadecuadas aplicaciones han provocado que los mosquitos desarrollaran resistencia a varios de estos insecticidas (Flores *et al.*, 2001; Fonseca y Quiñones, 2005; Bisset *et al.*, 2003; OMS, 2016).

Tomando en consideración esta situación, se han investigado alternativas para realizar el control de las poblaciones de vectores por antagonistas biológicos como: hongos entomopatógenos, bacterias, nematodos, crustáceos, peces larvívoros (Rodríguez y Arredondo, 2007). Una de las bacterias que se ha utilizado en el control es *Bacillus thuringiensis* cuyas δ – endotoxinas funcionan de manera eficaz en diferentes especies que afectan la agricultura, la actividad forestal y vectores de

patógenos a humanos y animales, debido a esto es uno de los productos de origen biológico más utilizado comercialmente en el control de diversos insectos actuando principalmente sobre sus formas larvarias.

1.1. Prevención y control de vectores

Los objetivos del control de vectores, en el caso de los mosquitos son: mantener las poblaciones de mosquitos en densidades aceptables, reducir la longevidad de las hembras, minimizar el contacto del mosquito-vertebrados y con ello evitar la transmisión de enfermedades. Estas acciones minimizan los efectos molestos y perjudiciales de las picaduras y la pérdida de sangre e interrumpir la transmisión de enfermedades (Mulle y Duden, 2002).

Método de control más utilizado para reducir las poblaciones es el control químico, usando insecticidas contra larvas o adultos; incluyendo compuestos inorgánicos tales como arseniato de cobre, aceite y productos organoclorados como diclorodifeniltricloroetano (DDT) y la dieldrina, estos son aplicados sobre contenedores de agua que sirven como hábitat de larvas (Bautista *et al.*, 2004). Los larvicidas registrados con mayor frecuencia son aceites minerales, organofosfatos y reguladores de crecimiento; la rápida degradación de los aceites en el agua, penetración a sistemas traqueales de larvas y pupas impidiendo la respiración. Los organofosforados tales como: temefos, clorpirifos funcionan como venenos al sistema nervioso. El regulador de crecimiento en insectos Metopreno es la imitación de la Hormona Juvenil e interfiere con la metamorfosis y la emergencia. La formulación de los larvicidas depende del estado del mosquito, el tipo y tamaño del hábitat, el método de aplicación, la composición química del agua y la presencia de organismos que no son insectos blancos podrían verse afectados negativamente (Mulle y Duden, 2002). Los adulticidas se aplican sobre las superficies donde los adultos reposan, en la vegetación o estructuras que sirven como albergues. La resistencia a los insecticidas como el DDT (Flores *et al.*, 2001), temefos (Fonseca y Quiñones, 2005), organofosforados y piretroides (Figuroa *et al.*, 2006), es consecuencia importante de su uso y se ha desarrollado en muchas poblaciones de

Sin embargo, el control biológico constituye una alternativa disponible para contrarrestar la resistencia que los insectos desarrollan respecto a los insecticidas químicos. Una de las principales ventajas del control biológico es que actúa directamente sobre los organismos blanco sin afectar a otros organismos ni al ambiente, se debe a su especificidad (Nicholls, 2008). El objetivo de los programas de control biológico modernos es integrar el manejo de plagas para reducir la abundancia de mosquitos y la prevalencia de enfermedades, usando combinaciones prudentes de varios métodos, además debe formar parte del Manejo Integrado de Plagas (MIP). El uso de organismos para reducir la densidad de población que no causen daño y al mismo tiempo permite la sobrevivencia de la población que lo controla; actualmente se utilizan organismos depredadores, parásitos y patógenos para los mosquitos, tales como hongos, bacterias, protozoos, virus, nematodos e incluso la acción de artrópodos y peces con acción depredadora y demás (Gallegos *et al.*, 2004).

Las ventajas de este tipo de control es que se dirige a una especie en particular; es un método barato, seguro, selectivo y eficiente; que permite ser usado de forma preventiva, no contamina el ambiente y no destruye vida silvestre (Nicholls, 2008).

1.2. La familia Culicidae.

La familia culicidae, es un grupo de importancia médico y veterinaria debido a que son transmisores de enfermedades arbovirales como: el Dengue, Fiebre amarilla, Chikungunya y el Zika. Estos se encuentran en casi todos los lugares del mundo, excepto Antártica pues las condiciones ambientales limitan su desarrollo, pues requieren de Temperatura y Humedad óptima para desarrollar su ciclo vital. Algunas especies han sido beneficiadas por las alteraciones del ambiente causadas por la acción antropogénica (Mullen y Durden, 2002), y con ello el cambio climático afecta la distribución geográfica de cada vector, de tal modo que altera la distribución potencial de los arbovirus (Jiménez, 2012).

La familia Culicidae, pertenece al orden Díptera, deriva de la palabra latín *culex*, es un miembro de Nematocera, del infra-orden Culicomorpha de Díptera. Compuesto por dos super-familias que incluyen a todos los nematóceros que pican y chupan, depredadores y chupadores de sangre. Los Simulidae y Ceratopogonidae pican a

vertebrados e invertebrados, la superfamilia Culicoidea comprende a Dixidae, Corethrellidae, Chaoboridae y Culicidae, el segundo y cuarto se alimentan de sangre de vertebrados. Sin embargo, entre los culicomorfos, la probosis es larga en los mosquitos; es el aparato bucal más especializado en picar de los Nematocera. La familia Culicidae consisten alrededor de 3,547 especies descritas; la clasificación actual comprende las subfamilias: Anophelinae, contiene a tres géneros; Culicinae, tiene 109 géneros organizados en 11 tribus y Toxorhynchitinae con cuatro géneros (Mulle y Duden, 2002; Mosquito Taxonomic Inventory, 2008).

- Morfología de *Aedes aegypti*.

Los huevos son ovoides y la capa más externa, el corión. Las larvas de mosquitos presentan cuatro estadios larvales parecidos entre sí, la cabeza tiene un par de ojos compuestos de agrupaciones de ocelos laterales, un par de antenas de tamaño y forma variable, el aparato bucal presenta cerdas, peinillas y limpiadores utilizados en la alimentación. Los cepillos palatales laterales en el labrum crean corrientes de agua que atraen partículas suspendidas hacia la boca. El tórax es ancho con tres segmentos. El abdomen es más angosto que el tórax y compuesto de ocho segmentos (Fig. 1).

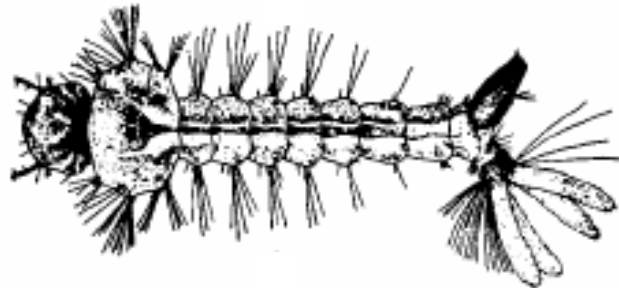


Figura 1. Anatomía de larva de *Ae. aegypti*. Figura tomada de Mullen y Duden, 2002.

A medida que las larvas crecen y se desarrollan, deben mudar su exoesqueleto tres veces, pasando por los cuatro estadios, alcanzando aproximadamente 0.8 cm. Cuando la larva de cuarto estadio muda, pasa al estado de pupa.

La pupa tiene forma de coma, con la cabeza y tórax fusionado en un cefalotórax, con el abdomen curvo (Fig. 2A). En la región dorsal del mesotórax tiene las trompetillas para poder realizar el intercambio gaseoso. El segmento ocho presenta

un par de paletas natatorias para el desplazamiento. Los imagos son delgados, con patas largas y delgadas, el cuerpo está cubierto de escamas, setas y vellos muy finos que dan el patrón de coloración de la especie; los ojos cubren la frente y los lados de la cabeza (Fig. 2B). Las antenas salen de entre los ojos, son largas y filamentosas; por lo que hay dimorfismo sexual. La probóscide es sobresaliente anteriormente; tanto la mandíbula como las maxilas penetran la piel y permiten lacerar el tejido para chupar sangre del huésped.

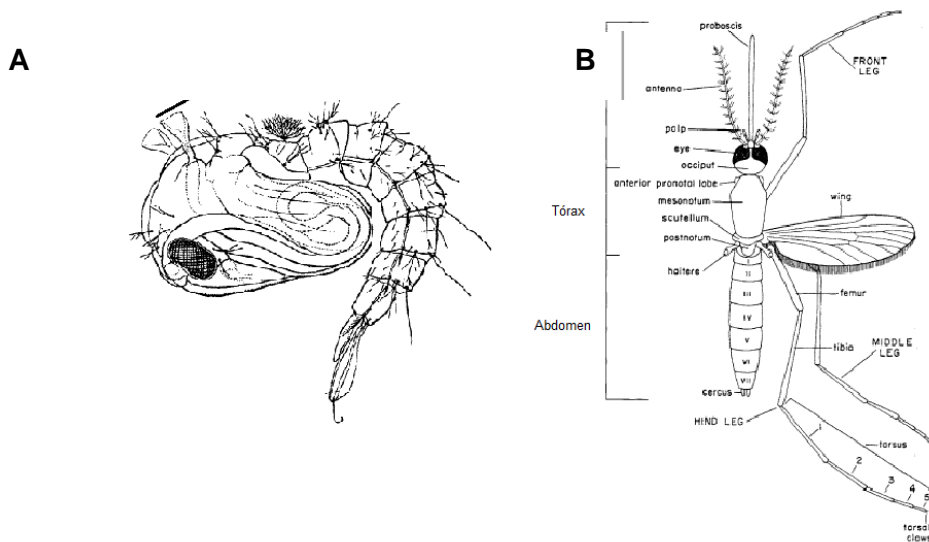


Figura 2. A) Morfología de pupa; B) Morfología de imago, vista dorsal. Figura tomada de Mullen y Duden, 2002.

- Ciclo de vida de *Aedes aegypti*.

El ciclo holometábolo se lleva a cabo en dos fases: fase acuática, donde eclosiona el huevo, se desarrollan los cuatro estadios larvarios y la pupa, y la fase aérea donde se alimenta y reproduce el imago (Fig. 3). La fase acuática se desarrolla en medios acuáticos naturales como charcos, cuerpos de agua, bromelias, axilas de plantas y otros que son formados por el descuido de la acción humana al dejar envases, cubetas, cacharros, material inservible, tanques destapados (Mulle y Duden, 2002). Al principio los huevos son blancos y cuando maduran se vuelven negros y si las condiciones son favorables (temperatura y humedad), este eclosionara. Las larvas se mantendrán la mayoría del tiempo en el fondo o en la superficie del agua, alrededor de 3-5 días se convertirán en pupas; las pupas ya no se alimentan y se

encuentran en la superficie del agua. El imago macho emerge primero y se queda en los alrededores, después de madurar sexualmente se da la copulación con las hembras recién emergidas (Bautista *et al.*, 2004); los machos se alimentan únicamente de la savia de las plantas mientras que las hembras se alimentan una sola vez de la savia para obtener energía y madurar sexualmente, posteriormente se alimentan de sangre de mamíferos o aves para obtener las proteínas necesarias e iniciar el desarrollo de los huevos en las ovariolas (Thirión, 2010).

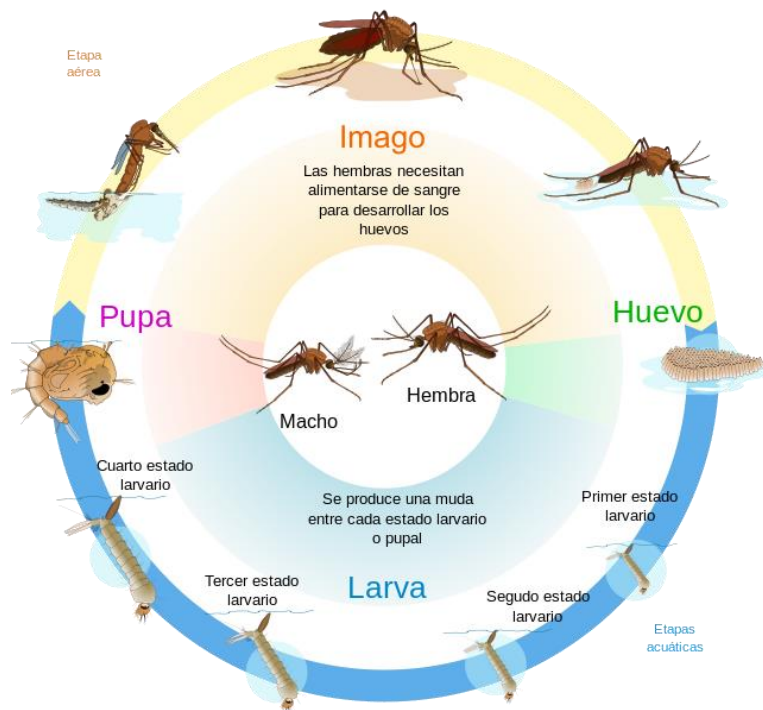


Figura 3. Ciclo de vida de mosquito; se representa la fase acuática y fase aérea. Figura tomada de Investigación y ciencia, Prensa científica.

Los nutrientes sintetizados y almacenados en glicógeno son usados para el vuelo, además el glicógeno es almacenado en las fibras musculares del tórax, sirviendo como recurso de energía para el vuelo inmediato si los azúcares y la hemolinfa han sido agotados.

La ingestión y digestión de sangre inicia el desarrollo de huevos por la estimulación de la cascada de hormonas originada del cerebro a los ovarios. El gran contenido de proteínas en la hemoglobina y el suero proveen los aminoácidos para la síntesis vitelogénica. Las proteínas también sirven como sustrato para generar lípidos y

glicógenos, que contribuye a la formación del huevo y la energía de reserva para el vuelo (Thiri6n, 2010).

➤ Los huevos que son puestos en o sobre el agua, no son resistentes a la desecaci6n y emergen poco despu6s de la embriog6nesis; los que son depositados sobre superficies h6medas resisten la desecaci6n y pueden permanecer en diapausa por d6as o meses hasta que las condiciones sean favorables. Esto puede estar controlado por la humedad, pero con mayor frecuencia es el resultado de una disminuci6n en la cantidad de ox6geno disuelto causado por actividad microbiana o descomposici6n de materia org6nica (Conde, 2003).

➤ Las larvas se alimentan de bacterias, hongos, algas, micro y macro-invertebrados peque6os y de material org6nico de origen animal y vegetal; colecta alimento filtrando, recogiendo, raspando, moliendo y cazando (Thiri6n, 2010).

➤ Las pupas tienden a ser menos activas y bajan al fondo cuando perciben disturbio.

➤ Los imagos, emergen y buscan un 6rea protegida entre la vegetaci6n. Dependiendo de la especie de mosquito, tienen un patr6n caracter6stico controlado por ritmos cardiacos end6genos. Por lo general, hay uno o dos periodos de vuelo al d6a, siendo diurno, nocturno o crepuscular. Se dispersan algunos metros del lugar donde emergieron y no rebasan los dos kil6metros de distancia; algunas especies se basan en la corriente del viento y la luz y son dispersados por cientos de kil6metros. Las hembras localizan al hu6sped por medio de compuestos vol6tiles caracter6sticos de los vertebrados como el di6xido de carbono, el 6cido l6ctico y el octenol.

- Cul6cidos de importancia m6dico-veterinaria

Las enfermedades transmitidas por vectores representan m6s del 17% de todas las enfermedades infecciosas (OMS, 2014). Los mosquitos son de gran importancia en la salud debido a que se alimentan de la sangre de humanos y animales, con la interacci6n de la saliva del mosquito se estimulan reacciones causando irritaci6n, aumentando la hipersensibilidad y la transmisi6n de microorganismos que causan infecciones y enfermedades a mam6feros (Mulle y Duden, 2002).

Las enfermedades transmitidas por mosquitos son causadas por virus, protozoos y nematodos; los mosquitos no son conocidos como transmisores de bacterias patógenos a humanos, con la excepción de la transmisión mecánica del agente causal de tularemia (*Francisella tularensis*) y el ántrax (*Bacillus anthracis*) (Mulle y Duden, 2002).

Existen alrededor de 520 virus asociados con mosquitos y causan aproximadamente 100 infecciones a humanos. Algunos arbovirus afectan a humanos y animales domésticos, de tal forma que ocasionan enfermedades a ambos (OMS, 2016).

Anopheles gambiae y *Anopheles arabiensis*, son importantes vectores de malaria y la filariasis linfática. *Culex pipiens* y *Culex quinquefasciatus* son otras especies de importancia médica en todo el mundo, pues se establecen en medios templados-tropicales; son vectores de patógenos tales como el Virus de la Encefalitis de San Luis y Filariasis linfática. *Cx. molestus* aparentemente es un híbrido de *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus*, adaptado a la temperatura de China y Japón (Mulle y Duden, 2002).

Varias especies de *Aedes* son de gran importancia médica, entre ellas: *Ae. africanus*, *Ae. bromeliae* y *Ae. luteocephalus* como transmisores de fiebre amarilla en África, *Ae. polynesiensis* y *Ae. pseudoscutellaris* transmiten la Filariasis linfática en las islas del Pacífico Sur, *Ae. albopictus*, el mosquito tigre, es similar *Ae. aegypti* y se encuentra en Asia; habita en ambientes rurales trópicos y subtrópicos (Mulle y Duden, 2002).

Ae. aegypti se distribuye en los trópicos y subtrópicos; es el vector principal del virus del dengue (clásico y hemorrágico), de la fiebre amarilla urbana, del virus del Chikungunya y el virus de Zika; aunque *Ae. albopictus* también es capaz de transmitirlos (Mulle y Duden, 2002). *Ae. aegypti* es de origen africano, introducido en América, se ha adaptado a coexistir con el hombre debido a la acción antropogénica que permite el establecimiento de una población en contenedores de agua, donde las hembras depositan los huevos. Las hembras se consideran las más eficientes de los mosquitos vectores por sus marcados hábitos domésticos, ya que satisface sus necesidades vitales en la vivienda humana. Los recipientes artificiales

como jarrones, floreros, llantas, tambos, canales de techo, pilas, tanques, cubetas, son los lugares más comunes para su cría (Fernández, 2005); algunos recipientes son más atractivos que otros, en especial los de color oscuro, de boca ancha, situados a nivel del suelo y dispuestos en la sombra (Thiri6n, 2002).

El dengue es una enfermedad febril causada por los serotipos DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4 del flavivirus y la inmunidad es permanente despu6s de la infecci6n. En los 6ltimos 50 a6os, la incidencia se ha multiplicado por 30, extendi6ndose a nuevos pa6ses; por lo que m6s del 40% de la poblaci6n mundial est6 expuesta al riesgo de contraer la enfermedad (Thiri6n, 2002). No hay vacuna ni medicamento para el tratamiento y las personas que lo contraen deben guardar reposo.

La fiebre amarilla es una enfermedad viral de regiones subtropicales afectando el h6gado y produciendo hemorragias agudas y da6os graves al tejido, es una enfermedad causada por un virus del g6nero *Flavivirus*. Cuando el mosquito *Ae. aegypti* pica e ingiere la sangre de reservorios infectados, ya sea el hombre o el mico, se inicia la incubaci6n de 8 a 12 d6as y se multiplica el virus en la pared g6strica y las gl6ndulas salivales del mosquito.

La fiebre Chikungunya es una enfermedad emergente causada por un alfavirus, el virus del chikungunya (CHIKV). Se describi6 por primera vez durante un brote ocurrido en el sur de Tanzania en 1952. Desde el 2004, el CHIKV se ha expandido provocando epidemias en Asia y 6frica. Los humanos son el reservorio principal del CHIKV durante los per6odos epid6micos; en los per6odos inter-epid6micos diversos vertebrados son involucrados como reservorios potenciales, incluyendo primates no humanos, roedores, aves y algunos mam6feros peque6os. Los mosquitos se infectan a partir de un hu6sped vir6mico, despu6s de un periodo promedio de incubaci6n extr6nseca de 10 d6as, el mosquito es capaz de transmitir el virus a un hu6sped susceptible.

El virus de Zika es un virus emergente del g6nero flavivirus, se identific6 por primera vez en Uganda en 1947, en macacos de la India. Posterior a esto se identific6 en 1952 en un humano de Uganda y la Republica Unida de Tanzania; se han registrado brotes en 6frica, las Am6ricas, Asia y el Pac6fico. Los brotes recientes se describieron en el Pac6fico en 2007 notificando 185 casos sospechosos, de los

cuales 49 se confirmaron y en 2013 se registraron en la Polinesia Francesa 10.000 casos de los cuales 70 fueron graves, teniendo complicaciones neurológicas o autoinmunes (OMS, 2015), en las Américas y África en 2015.

1.3. Control biológico con el uso de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis pertenece a la familia *Bacillaceae* y se encuentra en el grupo 1 del género *Bacillus*, forma parte del grupo *Bacillus cereus*, que incluye a *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* y *B. weihenstephanensis*.

Se descubrió en 1902, cuando el japonés Ishiwata la aisló de una larva de *Bombyx mori* (Lepidóptera: Bombycidae); a partir de entonces es considerada como alternativa eficaz en el control de larvas de culícidos (Nicholls, 2008).

B. thuringiensis es un bacilo Gram positivo, de flagelación peritrica, que mide de 3-5 μm de largo por 1-1.2 μm de ancho, anaerobio facultativo; fermenta glucosa, fructosa, trehalosa, maltosa y ribosa e hidroliza gelatina, almidón, glucógeno, esculina y N-acetil-glucosamina (Sauka y Benintende, 2008), se puede aislar con mayor frecuencia del suelo.

Durante la fase exponencial, las células vegetativas producen exotoxinas secretando al medio externo; endotoxinas que son aisladas como protoxinas dentro de una inclusión cristalina, conocido como cristal formada por uno o más cuerpos cristalinos proteicos, las δ -endotoxinas que son tóxicos para larvas de insectos, cuando son ingeridas. Las δ -endotoxinas se componen de dos grupos de proteínas que comparten propiedades bioquímicas: las proteínas Cry y las proteínas Cyt, que son cristalizados en la inclusión parasporal (Clements, 2000).

Las proteínas Cry son toxinas presentes en el cristal parasporal, con estructura tridimensional compuesta de tres dominios; el dominio I está formado por siete α -hélices, donde la hélice central está rodeada por las otras seis y este dominio participa en la formación del poro en la membrana de células intestinales de la larva (Arora, *et al.*, 2007); el dominio II está formado por tres láminas de estructura β en antiparalelo y participa en la interacción con el receptor, y el dominio III está formado por dos laminas plegadas β antiparalelas importante para la estabilidad y especificidad de la toxina, así mismo como la modulación de la actividad de canales

iónicos en el intestino medio del insecto (Clements, 2000). Las proteínas Cry se unen a receptores específicos en la membrana plasmática de las células epiteliales del intestino medio del insecto.

Las proteínas Cyt son específicamente tóxicas para larvas de dípteros, cada toxina consiste de un simple dominio con una masa molecular de 22-25 kDa. Evidencia experimental indica que las toxinas Cyt no entran a la membrana celular por la primera unión a los receptores, pero sí por la interacción con los lípidos de la membrana. Toxinas de algunas de las subespecies de *B. thuringiensis* son activas en contra de dípteros, y su interacción preferente con fosfolípidos insaturados (Reyes, 2011).

1.3.1. Alcalización de los fluidos del intestino medio

Cuando insectos susceptibles ingieren el cristal, el cuerpo parasporal de *B. thuringiensis* se inicia a solubilizar en un medio alcalino en el lumen del intestino medio antes de activarse las proteínas. El intestino medio de la larva de un mosquito es largo, cubierto de fibras musculares; el epitelio del intestino medio de larvas de mosquito está compuesto de varios tipos de células. Las células columnares son las más predominantes, acompañadas de células cuboidales (Clements, 2000).

1.3.2. Mecanismo de acción

Dos modos de acción han sido descritos por los efectos destructivos de las δ -endotoxinas sobre el epitelio del intestino medio de larvas de insectos, lisis coloidal y acción de tipo detergente.

Modelo de acción de poro. Se presenta cuando algunas δ -endotoxinas forman poros en las células del epitelio del intestino medio, además crean canales de fuga y conduce a la lisis celular y eventualmente la muerte de la larva. Cuando las moléculas de toxina se insertan en el ápice de la membrana, la conducción de cationes por los poros formados e incrementa la permeabilidad de cationes en la membrana.

Las proteínas conocidas como Cry, son ingeridas por larvas de lepidópteros, dípteros y coleópteros, para ser solubilizados en condiciones alcalinas en el

intestino medio, donde serán liberadas las protoxinas y activadas por la acción de las proteasas. Las proteínas Cyt se une a los receptores de las microvellosidades de células columnares del intestino para crear poros o canales de iones.

Acción de tipo detergente. La afinidad de las toxinas Cyt por fosfolípidos y las cadenas de ácidos grasos más las acciones citolíticas y hemolíticas de estas, causan un nuevo arreglo de la membrana lipídica, con la agregación de moléculas de toxina sobre la membrana desordenando la superficie de lípidos y produciendo temporalmente zonas defectuosas.

El mecanismo de acción se da en varias etapas, las partículas suspendidas en el agua son acarreadas a la cavidad pre-oral por corrientes generadas por los movimientos de partes bucales de la larva de mosquito y los cristales de *B. thuringiensis* son ingeridos y solubilizados en el intestino medio de la larva, liberándose las proteínas cristalinas en forma de protoxinas. Las proteasas intestinales procesan estas protoxinas para generar las toxinas activas que en su forma monomérica atraviesan la membrana peritrófica y se van a unir univalente a la caderina en la cara apical de la membrana epitelial; que desencadena una cascada de señalización dependiente de ion Mg^{2+} , de tal modo que estimula la exocitosis de caderinas y aumenta el número de receptores que reconocerán a las toxinas libres y así mismo amplificar la señal inicial (Schnepf *et al.*, 1998). La unión de los monómeros a la caderina facilita el clivaje proteolítico sobre el extremo N-terminal de la toxina y se establece una forma oligomérica pre-poro incrementando la afinidad de unión por un receptor secundario como la aminopeptidasa N o la fosfatasa alcalina, y como consecuencia forma un poro en el epitelio del intestino permitiendo que las esporas germinen por la entrada de la hemolinfa a la luz intestinal (Sansinenea *et al.*, 2004) y por ende un desequilibrio osmótico y la lisis celular; de tal forma que se impide la asimilación y retención de nutrientes necesarios para la larva. La muerte de la larva se puede acelerar al germinar las esporas y proliferar las células vegetativas en el hemocele de la larva (Sauka y Benintende, 2008).

Los síntomas de intoxicación que se observan a partir de que las larvas ingieren los cristales y esporas inician cuando se vuelven inactivas, con alteraciones de los hábitos alimenticios (Sansinenea *et al*, 2004), cese de la ingesta, parálisis del intestino, diarrea, debilidad, movimientos de nado inefectivos, parálisis total y finalmente la muerte; cuando sucede esto, la larva se vuelve marrón-negruzco. La actividad de *B. thuringiensis* depende de la densidad de población de los mosquitos en cualquiera de sus estados y de los caracteres morfo-funcionales de los mismo pues en los culícidos, las pupas no se alimentan y son estadios poco vulnerables a la acción de los cristales y sus toxinas que tienen efecto letal tras ser ingeridos por larvas (Cruz *et al.*, 2005).

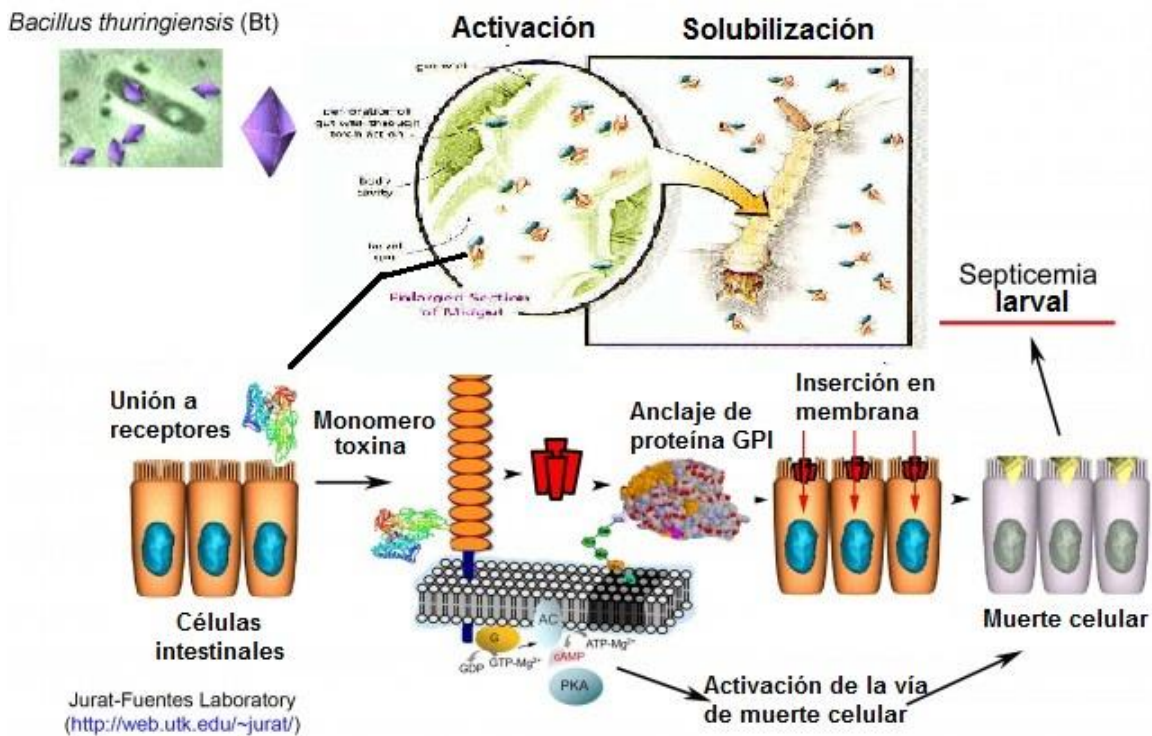


Figura 4. Modo de acción de *Bacillus thuringiensis* en el interior de una larva de mosquito. Figura elaboración propia.

2. ANTECEDENTES

El control de plagas ha sido utilizado a través de la historia humana, según datos históricos revelan que antiguas civilizaciones chinas usaban el mercurio como insecticida, en Egipto, Grecia y Roma solían utilizar compuestos de azufre y arsénico para el control de langostas. Sin embargo, el uso de pesticidas inicio en gran escala a partir del siglo XVIII (Writter, 1979).

2.1. Control enfocado a *Aedes aegypti*

Se han realizado campañas contra mosquitos como la que dirigió la Comisión Nacional para la Erradicación del Paludismo (CNEP) en México (Bautista *et al.*, 2004), utilizando principalmente insecticidas a base de químicos, que producen impactos negativos al medio ambiente y también a la población (Devine *et al.*, 2008), además el uso indiscriminado de pesticidas químicos incrementa la contaminación de productos agrícolas y el campo (Abarca *et al.*, 1992).

Suárez *et al.* (2005), evaluaron el copépodo *Macrocyclops albidus* como agente de control biológico sobre larvas de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*; reportando que los copéodos prefieren larvas de *Ae. aegypti* y mostraron supervivencia alta en todas las variantes ensayadas.

Otra especie común en el control de Culícidos son los peces carnívoros, un ejemplo es lo que Fimia *et al.* (2010) realizaron la colecta de los peces larvívoros *Gambusia punctata*, *G. puncticulata* y *Poecilia reticulata* en dos cuerpos de agua y observaron que la aparición de focos de mosquitos fue muy baja pues no sobrepasó el 1% en comparación a los lugares donde no se encontraban los peces.

Se han investigado alternativas para evitar el uso de químicos por daños a la salud y la resistencia por parte de los mosquitos a los insecticidas (Bisset *et al.*, 2009).

Un ejemplo de estudio de resistencia es el trabajo de Terán *et al.* (2014), ellos determinaron la resistencia a temefos y su mecanismo bioquímico en dos cepas de *Ae. aegypti* de Ecuador, reportando un nivel moderado de resistencia a temefos basado en una actividad incrementada de la esterasa-A4.

La empresa LABIOFAM (1986), produce Bactivec® usado en América Latina (excepto Chile y Uruguay), Asia, África y Medio Oriente. Este producto es una formulación acuosa que tiene como ingrediente activo esporas y cristales de *Bacillus*

thuringiensis var. *israelensis*, es un biolarvicida selectivo para larvas de mosquito que a su vez es efectivo, de acción rápida y prolongada (7-60 días), biodegradable e inocuo para el hombre, animales y plantas (Miranda *et al.* 2003). Dada esta premisa, Gomes y Costa (2004) evaluaron tres formulaciones de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SH-14: BACTIVEC®, G y WGD en un municipio de Brasil con altos niveles de infestación de *Aedes aegypti*, obteniendo que el uso del biolarvicida Bactivec® reduce en mayor porcentaje el índice de infestación en casa. Por otro lado, Miranda *et al.* (2003), utilizaron 1,021 frascos de Bactivec reportaron una eficacia de 95.9% en los tanques bajos tratados con este producto, además es un producto accesible por su precio bajo en comparación con otros productos.

Por otro lado, Gato *et al.* (2008) evaluaron la resistencia por parte de *Ae. aegypti* hacia *B. thuringiensis* var. *israelensis* en lugares donde se ha aplicado la formulación líquida de Bactivec® y en cepas de laboratorio bajo presión de selección y no se presentó evidencia de aparición de resistencia a la formulación de Bactivec®, por lo que no se han reportado casos de resistencia y que es una alternativa vigente en el control del vector.

Cuando se realizaron bioensayos de seguridad para determinar su patogenicidad en mamíferos, pasó todas las pruebas (Sansinenea *et al.*, 2004). En productos a base de esta bacteria como lo es Bactivec®, tampoco se ha reportado efectos negativos a organismos no blanco, un ejemplo de esto es el ensayo para evaluar su toxicidad/patogenicidad en ratas y conejos albinos como lo realizó Mancebo *et al.* (2003). Ellos usaron el producto por vía oral en ratas y por vía dérmica en conejos, observando en los dos ensayos si existían cambios en el peso corporal, además se observó la coloración de heces fecales, fluidos y órganos en el caso de la dosis oral y en ambos casos no ocurrieron mortalidades, ni evidencia de toxicidad/patogenicidad respecto al tratamiento.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El área de Ciudad Universitaria de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, ocupa 1,010,000 m² ubicada entre Av. San Claudio, Blvd. Valsequillo y Blvd. Municipio Libre; en la colonia Jardines de San Manuel, sur de la ciudad de Puebla. Es un área que cuenta con áreas verdes y dos cuerpos de agua amplios, condiciones favorables para la cría de mosquitos, por lo que hay incremento de sus poblaciones, que varían a lo largo del año, y provocan serias molestias a los habitantes circundantes y los usuarios de las instalaciones.

Las especies de mosquitos son generalistas, sin embargo, la escasa fauna asociada a sus ecosistemas, invadidos con fines sociales por el hombre ha provocado la adaptación antropofílica. Debido a la preocupación ambiental y problemas de la salud pública por la transmisión del virus de dengue, virus de Chikungunya y el virus del Zika, se buscan alternativas para disminuir las poblaciones de mosquitos por un antagonista biológico.

Por lo que el uso de un larvicida biológico, como lo es *Bacillus thuringiensis* que es eficaz contra las larvas de mosquitos como *Aedes aegypti*, actuando principalmente sobre formas larvarias de los insectos.

Tras un compromiso ambiental la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla aprueba el uso de estrategias alternativas, amigables con el medio ambiente.

4. HIPÓTESIS

Las cepas de *Bacillus thuringiensis* tendrán un efecto sobre larvas de los cuatro estadios de *Aedes aegypti* provocando al menos el 50% de mortalidad.

El efecto del producto Bactivec® provocara la muerte en 24 horas de al menos el 50% de larvas de culícidos en criaderos de Ciudad Universitaria.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general: Determinar el efecto de las cepas de *Bacillus thuringiensis*, en larvas de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio y así mismo evaluar el efecto del producto Bactivec® en especies de culícidos en criaderos de Ciudad Universitaria.

5.2. Objetivos particulares:

- Determinar el efecto de seis cepas de *B. thuringiensis* en larvas de los cuatro estadios de *Ae. aegypti*, en condiciones de laboratorio.
- Evaluar el producto Bactivec® sobre especies urbanas, en criaderos dentro del área de C.U.
- Identificar los criaderos artificiales presentes en Ciudad Universitaria.
- Identificar las especies de Culícidos presentes en los distintos tipos de criaderos de C.U.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Determinar el efecto de 6 cepas de *B. thuringiensis* en larvas de los 4 estadios de *Ae. aegypti*, en condiciones de laboratorio.

6.1.1. Obtención de cepas de *Bacillus thuringiensis*.

Las cepas fueron aisladas de muestras de suelo y otorgadas por el Centro de Investigación para Estudios Avanzados (CINVESTAV) unidad Irapuato, las muestras proporcionadas consisten de un polvo fino que contiene las esporas y cristales de la bacteria; en el laboratorio, se prepararon las cepas 10 mg/ ml en Tween 80 al 0.01% y se realizaron diluciones seriadas hasta tener una concentración 0.6% tomando como referencia la concentración del producto Bactivec®, este procedimiento se realizó con las 6 cepas diferentes.

6.1.2. Cría y mantenimiento de *Ae. aegypti*, cepa Rockefeller.

La colonia de *Ae. aegypti* se mantiene dentro del insectario del Laboratorio de Parasitología y Vectores ubicado en la Escuela de Biología, con temperatura de 26 a 28°C, humedad relativa de 75% y fotoperiodo de 12 horas. La cepa es procedente del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, Cuba; los huevos se colocaron en recipientes con agua a temperatura de 27°C para su eclosión, después de eclosionadas las larvas se alimentaron con alimento en polvo para peces diluido en agua destilada. Los adultos que recién emergían se colocaban dentro de una caja de 60x60x69 cm cubierta de malla, que en su interior contenía una solución de azúcar y miel al 50% contenida en cajas Petri con torundas estériles para alimentar a los machos, mientras que las hembras son alimentadas con sangre contenida en condones, previamente lavados, a 36°C. Para la recolección de huevos se coloca una ovitrampa cubierta en su interior con papel estraza, después se retira el papel estraza conteniendo los huevos y se pone a secar durante 48 horas para su desecación, la recolección de los huevos se realiza con un pincel fin y estos son empaquetados en sobres de papel estraza para mantenerse secos y frescos.

6.1.3. Bioensayo

Se utilizaron larvas de *Ae. aegypti* Cepa Rockefeller de primero, segundo, tercero y cuarto estadio, las cuales se obtuvieron de la progenie de hembras del laboratorio;

las larvas con las que se realizó el experimento no se alimentaron durante el experimento para minimizar la variabilidad causada por las condiciones nutritivas y metabólicas (Russell *et al.*, 2003). Las condiciones ambientales se mantuvieron estables durante el tiempo del experimento con fotoperiodo de 12:12 horas., temperatura de 27°C y humedad de 75%.

Se utilizaron 10 larvas contenidas en vasos de plástico de 250 ml con 200 ml de agua con tres repeticiones de acuerdo a la metodología de Lonc *et al.* (2001) y Flores *et al.* (2011), donde se les administró una sola dosis; esto se realizó para los cuatro estadios larvales con su respectiva repetición (Figura 5).

6.1.4. Análisis de datos. A partir de obtener los datos de la mortalidad de las larvas de cada estadio, se realizó estadística descriptiva y se aplicó un test de normalidad de Shapiro-Wilk para contrastar la normalidad de los datos. Posteriormente se realizó un test de Friedman para determinar si los efectos de las seis cepas difieren, el test se realizó en el programa estadístico Statgraphic Centurion XVI (StatPoint Technologies, 2011)

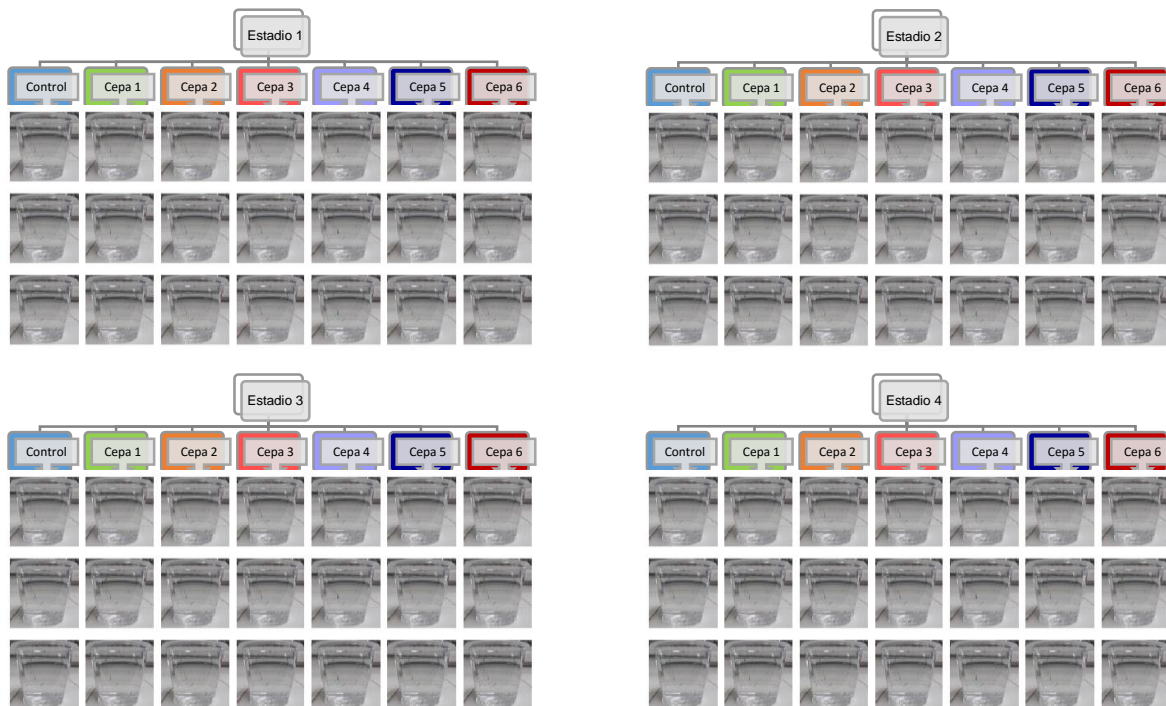


Figura 5. Evaluación de 6 de cepas de *Bacillus thuringiensis*, para los 4 estadios larvarios de *Aedes aegypti*.

6.2. Evaluar el producto Bactivec® sobre especies urbanas, en criaderos dentro del área de Ciudad Universitaria.

En el ensayo en campo se evaluó la actividad larvica del producto Bactivec® sobre especies de culícidos presentes en el área de Ciudad Universitaria de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, que ocupa 1,010,000 m² ubicada entre Av. San Claudio, Blvd. Valsequillo y Blvd. Municipio Libre; en la colonia Jardines de San Manuel, sur de la ciudad de Puebla, coordenadas geográficas 18°59'56.8" latitud norte y 98°11'57' latitud este. Es un área que cuenta con áreas verdes y dos cuerpos de agua amplios, condiciones favorables para la cría de mosquitos.

Bactivec® es una suspensión acuosa de color gris que contiene como ingrediente activo a esporas y cristales endotoxicos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* serotipo H-14 - 0.6%, 95% ingredientes inertes y preservante 0.01%. Tiene una potencia biológica de 600 UTI/mg y se dispersa fácilmente en el agua de los criaderos.

6.2.1. Distribución y caracterización de criaderos

Se identificaron los criaderos presentes en el área de C. U., caracterizando el tipo (diez tipos de recipientes: tanque elevado, tanque bajo, barril y cilindros, baldes y bateas, ollas, llantas, canaletas, cantaros, floreros y macetas e inservibles) según Fernández (2005), se estimó el índice entomológico de recipientes para estimar la presencia de larvas en los criaderos y se calculó la densidad relativa (Ruiz y Cáceres, 2004) de larvas en cada criadero antes y 24 horas después del tratamiento por medio del índice de cucharón (250 ml), esto se realizó al sumergir 5 veces el cucharón y la muestra obtenida se colocaba en una charola donde se realizaba el conteo de todas las larvas capturadas. Las larvas colectadas se colocaron en recipientes con agua del mismo criadero y fueron transportadas al laboratorio donde se sacrificaron por choque térmico y se resguardaron en alcohol absoluto para su posterior identificación utilizando las claves taxonómicas de Ibáñez y Martínez (1994), posteriormente se prosiguió a la aplicación del producto Bactivec®, mediante cálculos para aplicar la dosis correcta, según las indicaciones del frasco

10 gotas/50 Lts., esto se consiguió tras medir el volumen del criadero en los criaderos y aplicar una regla de tres.

Se tomaron muestras de agua de un criadero, debido al volumen de agua que lo permitió, con frascos esterilizados, los cuales se abrieron cuando se encontraron en el interior del agua y evitar que la muestra a tomar se oxigenara y así causar sesgos en las pruebas, las propiedades físico-químicas del agua de los criaderos que se midieron fueron: temperatura, pH, dureza (Kit 4482-DR-L101, Hardness), alcalinidad (Kit DRT 0-200 ppm 491-DR-01 LaMotte), cloro (Kit PSC-DR 4503-DR, LaMotte), O₂ (Kit 5860-01, LaMotte), NO₄ (Kit PK184, Palintest), con Kits específicos para cada uno .

6.2.2. Análisis de datos. Después de identificar y contabilizar el número de criaderos y para obtener el índice de recipientes se aplicó la fórmula:

$$\text{Índice recipientes} = \left(\frac{\text{No. recipientes positivos}}{\text{No. recipientes inspeccionados}} \right) 100$$

Para calcular la densidad relativa se aplicó la fórmula:

$$\text{Densidad rel.} = \frac{\text{No. total de larvas}}{\text{No. de cucharonadas}}$$

7. RESULTADOS

7.1. Determinación del efecto de seis cepas de *B. thuringiensis* en larvas de los 4 estadios de *Ae. aegypti*, en condiciones de laboratorio.

De las seis cepas evaluadas en los cuatro estadios larvarios de *Ae. aegypti*, se observó mayor efecto de mortalidad en los estadios 1 y 2, mientras que en los estadios 3 y 4, ninguna cepa sobrepasó el 40% de mortalidad y en las cepas 4 y 5 presentaron el mismo porcentaje de mortalidad que el control.

En la tabla 1 se muestra la mediana \pm error estándar (E.E.) de las 6 cepas en los 4 estadios larvales, las letras en la columna de la mediana representan la diferencia entre los tratamientos respecto al control. Las letras que son iguales muestran que no hay diferencias significativas entre las cepas evaluadas.

Tabla 1. Resultados del análisis estadístico aplicado a los tratamientos de laboratorio.

Estadio	Tratamiento	Media \pm E. E	Mediana
1	1	70 \pm 10	80 i
	2	60 \pm 15.27	70 h
	3	43.33 \pm 13.33	30 d
	4	50 \pm 0	50 f
	5	33.33 \pm 6.66	40 e
	6	53.33 \pm 6.66	60 g
2	1	53.33 \pm 12.01	60 g
	2	50 \pm 10	60 g
	3	60 \pm 0	60 g
	4	70 \pm 20	90 j
	5	40 \pm 20	20 c
	6	43.33 \pm 13.33	30 d
3	1	23.33 \pm 3.33	20 c
	2	10 \pm 5.77	10 b
	3	16.66 \pm 3.33	20 c
	4	3.33 \pm 3.33	0 a
	5	6.66 \pm 3.33	10 b
	6	20 \pm 5.77	20 c
4	1	13.33 \pm 3.33	10 b
	2	10	10 b
	3	13.33 \pm 3.33	10 b
	4	0	0 a
	5	0	0 a
	6	13.33 \pm 3.33	10 b
Control		0	0
Total		30.26 \pm 3.04	20.0

Test de Friedman con intervalo de 95% de confianza.

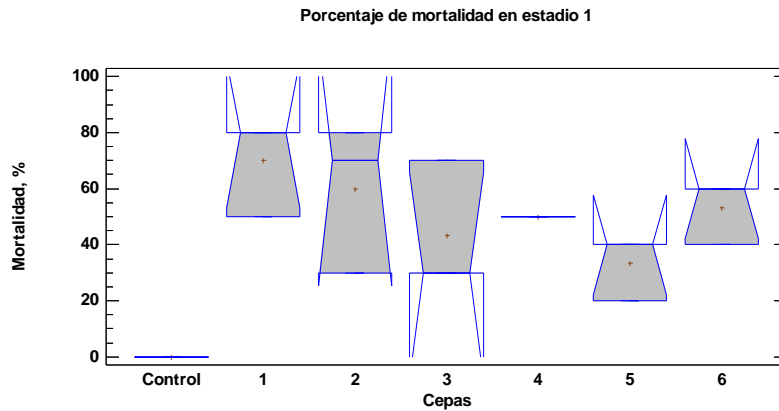


Figura 6. Porcentaje de mortalidad en el estadio 1 de *Ae. aegypti* respecto a las 6 cepas evaluadas de *B. thuringiensis*.

En el estadio 1, se observa que la cepa 1 alcanzo la máxima mortalidad con el 80 % de mortalidad, le sigue la cepa 2 con el mismo porcentaje y la cepa 3 logro mortalidad en 70%; el resto de las cepas no logro sobrepasar el 50% de mortalidad.

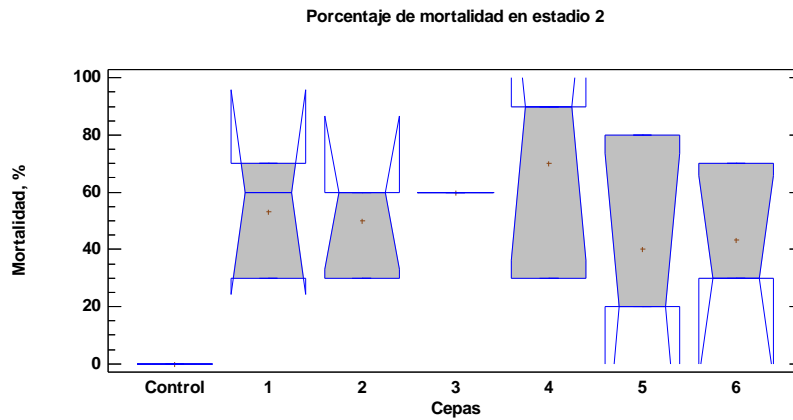


Figura 7. Porcentaje de mortalidad en el estadio 2 de *Ae. aegypti* respecto a las 6 cepas evaluadas de *B. thuringiensis*.

En el estadio 2, las cepas 1 y 2 lograron casi el 70% de mortalidad, la cepa 3 sobrepaso el 50% sin embargo se mantuvo constante, las cepas 4 y 5 alcanzaron el 80% de mortalidad, sin embargo, se nota un rango de mortalidad amplio, mientras que en la cepa 6 es menor a estos dos.

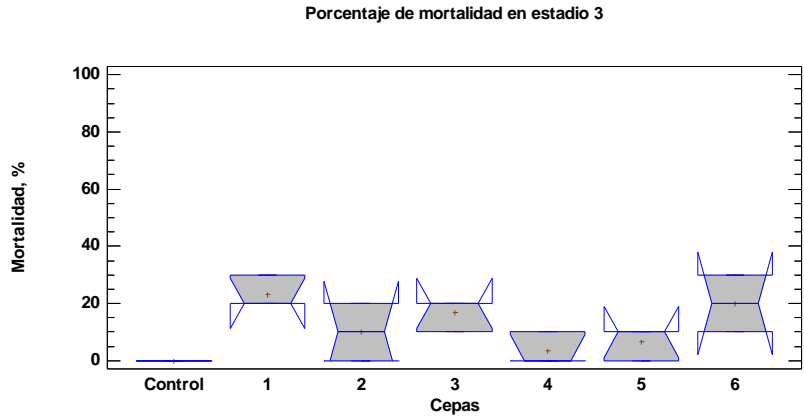


Figura 8. Porcentaje de mortalidad en el estadio 3 de *Ae. aegypti* respecto a las 6 cepas evaluadas de *B. thuringiensis*.

En el estadio 3, en general se observa que ninguna de las cepas alcanzo el 50% de mortalidad, la cepa 1 presento mayor mortalidad seguida de la cepa 6; las cepas restantes tienen comportamiento similar de mortalidad, casi igual al control.

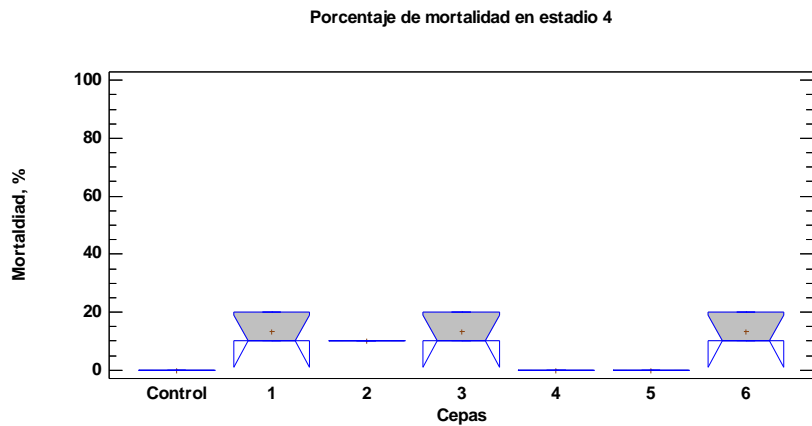


Figura 9. Porcentaje de mortalidad en el estadio 4 de *Ae. aegypti* respecto a las 6 cepas evaluadas de *B. thuringiensis*.

En el estadio 4, las cepas 1, 3 y 6 alcanzaron el 20% de mortalidad, la cepa 2 solo el 10% y se mantiene constante, mientras que las cepas 4 y 5 tienen el mismo comportamiento que el control, pues no causaron ninguna muerte larval.

Con el valor de $p < 0.05$ del test de Friedman, se sugiere que hay un efecto toxico por parte de las cepas 1 y 2 en los primeros dos estadios larvales de *Ae. aegypti*.

7.1.1. Coloración de larvas muertas a causa de *B. thuringiensis*.

Las larvas tratadas con *B. thuringiensis* muestran una coloración típica marrón-oscuro del cuerpo, causado por la ingestión de las δ -endotoxinas de la bacteria, caso contrario al estado de larvas control que no fueron tratadas (Fig. 5).



Figura 10. Coloración típica de larvas muertas a causa de la ingestión de las δ -endotoxinas, a) larva que no fue expuesta a ninguna cepa de *B. thuringiensis*, b) y c) larvas tratadas con las cepas. Microscopio estereoscópico, objetivo 40X.

7.2. Evaluación del producto Bactivec® sobre especies urbanas, en criaderos dentro del área de Ciudad Universitaria.

En Ciudad Universitaria cuyas coordenadas geográficas son 18°59'56.8" latitud norte y 98°11'57" latitud este con una superficie de 102 hectáreas; inicialmente se identificó y caracterizaron los criaderos ubicados en el interior, en los criaderos identificados se evaluó el producto Bactivec®.

7.2.1. Distribución y caracterización de criaderos identificados.

Se identificó la distribución geográfica de los criaderos temporales en la zona de Ciudad Universitaria.

En total se registraron 27 criaderos dentro de Ciudad Universitaria, de los cuales 21 fueron positivos a larvas de mosquito, sin embargo, solo se trataron 4 debido a que en el resto de los criaderos no se pudo tener acceso y otros fueron eliminados como botellas y macetas. El índice de recipientes fue 78%, indicando alto riesgo de infestación por mosquitos. De estos, el tipo de criadero más común es de Tanque bajo. Los criaderos positivos fueron tratados con el insecticida Bactivec®.



Figura 11. Mapa de Ciudad Universitaria, donde se muestra con "X" los lugares donde se encontraron criaderos temporales. Fuente: GoogleMaps y elaboración propia.

En la figura 11 se marcan con "X" los lugares donde se localizaron los criaderos y donde se marca con una "X" más grande que las otras, se localizaron 9 criaderos del tipo canaleta, sin embargo, el más común fue el de tipo tanque bajo 12.

En la tabla 2 se muestra el lugar, el tipo de criadero, sus coordenadas y las especies encontradas en ese criadero, se identificaron 5 especies, donde *Cx. stigmatosoma* se localizó en tres criaderos de los tratados.

La densidad relativa se calculó en cada uno de los criaderos antes y 24 horas después de aplicar el producto, esta se calculó con la formula antes y como se puede observar en la tabla 3, disminuye en un rango de 60 a 75% la densidad de larvas en los criaderos tratados.

Tabla 2. Especies de culícidos identificadas en 4 criaderos.

Lugar de muestreo	Tipo de criadero	Coordenadas	Especies identificadas
Inst. Zeolitas	Inservible	N 18°59'44.3'' E98°11'58.5'' Altura 2,140	<i>Ae. epactius</i> <i>Ps. ciliata</i>
Invernaderos	Tina o balde	N 18°59'43.1'' E 98°11'57.4'' Altura 2,139	<i>Cx. stigmatosoma</i> <i>Cx. salinarius</i> <i>Cx. restuans</i>
Canchas futbol	Tanque bajo	N 18°59'53.8'' E 98° 11'55'' Altura 2,138	<i>Ae. epactius</i> <i>Cx. stigmatosoma</i>
Fuente CUVyTT	Fuente	N 18°59'54'' E 98° 12'65'' Altura 2,141	<i>Cx. stigmatosoma</i>

Los porcentajes de reducción larvaria más altos fueron en el criadero tipo tanque bajo, localizado en el interior de las canchas de futbol y la fuente ubicada frente a CUVyTT, mientras que el valor más bajo que fue de 60% pertenece al criadero tipo tina o balde en los invernaderos de la Escuela de Biología.

Tabla 3. Densidad relativa de larvas antes y 24 horas después de la aplicación de Bactivec® en criaderos.

Evaluación en campo de Bactivec® en criaderos de Ciudad Universitaria			
Criadero	Densidad relativa de larvas		% de reducción larvaria
	Pre-tratamiento	Pos-tratamiento	
Inst. Zeolitas	6	2	67
Invernaderos	5	2	60
Canchas futbol	8	2	75
Fuente CUVyTT	7	2	72

Criaderos artificiales encontrados en los inmuebles antes señalados.



Figura 12. Criadero de tipo tanque bajo. Localizado detrás del Círculo



Figura 13. Criadero de tipo maceta, eliminado.



Figura 14. Criadero de tipo fuente. Localizado frente de CUVyTT; tratado con Bactivec®



Figura 15. Criadero de tipo tanque bajo ubicado en los campos de futbol. Tratado con Bactivec®

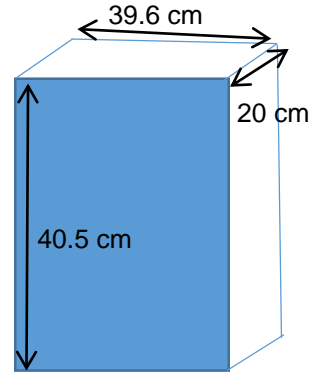


Figura 16. Criadero de tipo insertible. Localizado detrás de ICUAP-Zeolitas; tratado con Bactivec ®

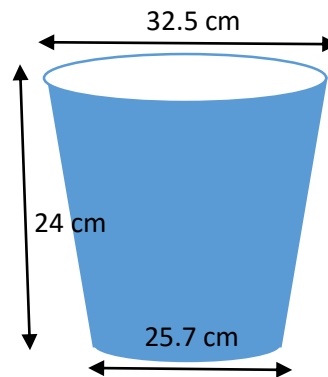


Figura 17. Criadero de tipo tina o balde. Localizado detrás de la Unidad de Seminarios.

Pruebas físico-químicas de muestra de agua del criadero, ubicado frente al edificio de CUV y TT. Solo se logró hacer las pruebas físico-químicas de un criadero, debido al volumen de agua que permitió la prueba.

Las concentraciones de cloro, O_2 y NO_4 resultaron bajas, indicando que el agua contenida tiene las condiciones favorables para la cría y desarrollo de larvas de mosquitos, sin embargo, solo se encontró una sola especie en este lugar.

Tabla 4. Propiedades físico-químicas del agua del criadero frente a CUVyTT.

T °C	pH (U)	Dureza (ppm)	Alcalinidad (ppm)	Cloro (ppm)	O_2 (ppm)	NO_4 (mg/L)
27	6.72	76	72	0.4	2	0

8. DISCUSIÓN

8.1. Determinar el efecto de seis cepas de *B. thuringiensis* en larvas de los 4 estadios de *Ae. aegypti*, en condiciones de laboratorio.

Los resultados obtenidos muestran que las cepas tienen baja toxicidad sobre los estadios larvarios, debido que se registró la mortalidad de 80% hasta las 76 horas por parte de las cepas 1 y 2 después de ser aplicadas sobre las larvas del primer estadio; estos porcentajes son similares a cepas nativas procedentes de cultivos en un tiempo de 72 horas en larvas de tercer estadio de *Ae. aegypti*, según lo reportado por Huerta (2013).

En este ensayo la mayor mortalidad se registra solo para los dos primeros estadios, en cambio Reyes (2011), reporto mortalidad del 100% en larvas del estadio cuatro de *Ae. aegypti*; él evaluó cepas aisladas de Oaxaca, México; donde tres cepas tuvieron este efecto sobre las larvas.

Algunos factores pueden afectar la actividad de las toxinas de *B. thuringiensis* (Ochoa y Arrivillaga, 2009), como el nulo recambio de agua durante el experimento, como lo menciona Lee y Zairi (2005), donde obtuvo que la actividad toxica de *B. thuringiensis* es alta cuando se realiza la reposición diaria de agua en comparación con la actividad toxica baja debido a que no se realizó reposición de agua, especialmente en dosis altas.

Otro factor importante a considerar tiene que ver con la flotabilidad o la capacidad de las formulaciones para mantenerse en suspensión (Delgado, 2005) debido a que *Aedes aegypti* puede sumergirse y raspar-filtrar las partículas depositadas (Dahl *et al.*, 1993), disminuyendo la ingesta de la toxina suspendida en la superficie del agua.

Las larvas de mosquito son susceptibles a las variaciones de temperatura, incrementando el descenso de varias larvas de mosquito (Clements, 2000), esto explicaría el sesgo que obtuvieron algunas cepas con respecto a otros estadios cercanos como el 1 y 2.

Se han aislado cepas de *B. thuringiensis* de muestras de suelo en México, estas se han caracterizado y ensayado en lepidópteros y coleópteros de importancia agrícola

(Gallegos *et al.*, 2003; Fonseca *et al.*, 2013), sin embargo, faltan trabajos sobre dípteros (Tamez *et al.*, 2001; Rosales *et al.*, 2003).

8.2. Evaluar el producto Bactivec® sobre especies urbanas, en criaderos del área de Ciudad Universitaria.

Después de identificar los criadero positivos y calcular el índice de criaderos el resultado fue de 77.7% y a pesar de los escasos trabajos realizados en México Ponce *et al.* (2003) reportaron en Nuevo León, la presencia de 100 depósitos presentando un 50% y 25% de positividad en las colonias Nuevo México y Fernando Amilpa, respectivamente; posterior a la aplicación de Vectobac estos se reducen a la mitad; este trabajo se suma a los trabajos que aplican productos a base de *B. thuringiensis* sobre larvas de mosquitos.

Sin embargo, se han realizado estudios como este en América Latina debido a la importancia del control de mosquitos. Las características físico-químicas del agua del criadero difieren de las reportadas por Rojas (2008), pues la concentración que midió de O₂ es de 12 ppm en comparación con la que se reporta que es de 2 ppm, la dureza varía poco al igual que el pH y NH₄ fue similar; según la fisiología de larvas, el medio acuático donde se encuentran debe presentar baja concentración de oxígeno (Clements, 2000), por lo que el agua de este criadero favorece el desarrollo de larvas de mosquito. Así mismo, las especies que identifiqué fueron *Anopheles albimanus*, *An. triannulatus*, *Aedes sp.*, *Culex sp.*, *Uranotaenia sp.*, *Aedomyia squami-pennis* y *Mansonia*, mientras que las especies que se identificaron de los criaderos de CU fueron *Ae. epactius*, *Ps. ciliata* y en su mayoría del género *Culex*. Por otro lado, Carvajal *et al.* (2009), caracterizaron los sitios de cría de *Ae. albopictus*; ellos cuantificaron las condiciones físico-químicas de los criaderos como el volumen, T° del criadero y del ambiente, saturación de O₂, O disuelto, turbidez, conductividad y pH, que en comparación con los resultados que se obtuvieron del agua del criadero solo se tomó la T° ambiental, el pH, dureza, alcalinidad, dureza, O₂ y NO₄, donde la T°, pH y O₂ son similares a las condiciones de los criaderos que describen con presencia de *Ae. albopictus*, *Chironominae* y *Cx. quinquefasciatus*.

Stein *et al.* (2002), identificaron los principales criaderos para *Aedes aegypti* y culícidos asociados, Argentina; donde contaron y examinaron las especies presentes en ellos resultando *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* las especies más abundantes y las botellas representaron la categoría de recipientes en su mayoría, aunque contenían menos del 4% de larvas y pupas, en cambio los neumáticos que en menor cantidad era el hábitat principal en la producción de *Ae. aegypti*. En este trabajo, se reportó que la especie *Cx. quinquefasciatus* es la más encontrada y se difiere en el tipo de criadero, el más abundante fue del tipo tanque bajo.

Marquetti *et al.* (2000), identificaron los criaderos de Culícidos en un ecosistema urbano de la Habana, Cuba; detectaron 3,634 depósitos positivos con presencia de cinco géneros de mosquitos, *Cx. quinquefasciatus* fue la especie predominante en los depósitos seguido de las especies *Ae. mediovittatus*, *Ae. aegypti*, y *Cx. nigripalpus*.

Dhang (2011), menciona que las especies exóticas *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* han llamado la atención de autoridades de Salud Pública y programas de control, por la abundancia de poblaciones siendo un gran riesgo latente; tomando en cuenta esto, coincido con lo que menciona dicho autor pues en el área de C.U. se encuentra en su mayoría las especies de *Ae. epactius* y *Cx. stigmatosoma* debido al alto índice de recipientes, áreas verdes y fuente de alimento, estas especies por el momento no transmiten una enfermedad, pero representa un gran riesgo.

La mayoría de los países de América Latina han reportado la presencia de *Cx. quinquefasciatus* como una de las especies predominantes, debido a la tolerancia a temperaturas altas o bajas y condiciones adversas de los depósitos de agua donde se crían (Marquetti *et al.*, 2000; Suárez *et al.*, 2005 y Rojas, 2008).

9. CONCLUSIONES

- En el control de mosquitos transmisores de enfermedades se usan productos químicos a base de organoclorados y organofosforados, pero esto trae como consecuencia la resistencia por parte de los mosquitos y la contaminación al ambiente, por lo que el aislamiento y uso de *B. thuringiensis* es una alternativa en el manejo integrado para el control de insectos vectores, como *Ae. aegypti*.
- De las cepas evaluadas, las cepas 1 y 2 tuvieron efecto sobre larvas del estadio 1 causando la mortalidad del 80% y en el estadio 2 una mortalidad del 70%, por lo que se concluye que estas dos cepas tienen un efecto tóxico sobre larvas de los primeros dos estadios.
- En la evaluación de Bactivec®, este disminuyó la densidad larvaria de 60% hasta el 75% en las primeras 24 horas en los criaderos tratados, por lo que fue efectivo al reducir las densidades de especies de culícidos presentes en el área de Ciudad Universitaria.
- El criadero de tipo tanque bajo fue el más común, y el índice alto de criaderos indica riesgo de infestación por mosquitos.
- Las especies identificadas fueron: *Aedes epactius*, *Psorophora ciliata*, *Culex stigmatosoma*, *Cx. salinarius* y *Cx. restuans*; siendo la especie más frecuente *Cx. Stigmatosoma*.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, C.; Martínez, A.; Caro, M.; Quintero, R. (1992). Optimización del proceso de fermentación para producir *Bacillus thuringiensis* var. *aisawai*. Universidad: Ciencia y Tecnología. Vol. 2 (3).
- Arora, N.; Agrawal, N.; Yerramilli, V. y Bhatnagar, R. (2007). Biology and applications of *Bacillus thuringiensis* in integrated pest management. En A. Ciancio y K.G. Mukerji (Eds.) *General concepts in Integrated Pest and Disease Management*. (pp. 227-244). India: Springer.
- Badii, M. y Varela, S. (2008). Insecticidas organofosforados: efectos sobre la Salud y el Ambiente. *Toxicología de insecticidas*. Vol. 1 (28), pp. 5-17.
- Bautista, N.; Bravo-Mojica, H.; Chavarin-Palacio, C. (2004). Cría de insectos plaga y organismos benéficos. Primera edición. CONABIO, México Pp. 323.
- Bisset, A.; Rodríguez, M.; Molina, D.; Díaz, C y Soca, L. (2001). Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Aedes aegypti*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. Vol. 53 (1), pp. 37-43.
- Bisset, A.; Rodríguez, M.; Cáceres, L. (2003). Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en dos cepas de *Aedes aegypti* de Panamá. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. Vol. 55 (3), pp. 191-195.
- Bisset, A.; Rodríguez, M.; San Martín, L.; Romero, E.; Montoya, R. (2009). Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. *Revista Panamericana de Salud Pública*. Vol. 26(3), pp. 229-234.
- Carvajal, J.; Moncada, L.; Rodríguez, M.; Pérez, L. y Olano, V. (2009)- Caracterización preliminar de los sitios de cría de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (Díptera: Culicidae) en el municipio de Leticia, Amazonas, Colombia. *Biomédica*. Vol. 29 (4), pp. 13-23.
- Clements, N. (2000). The biology of mosquitoes: Development, nutrition and reproduction. Vol. 1. 2° Edition; New York, USA: CABI Publishing. Pp. 509.
- Conde, M. (2003). Estudio de la longevidad y el ciclo gonotrófico del *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), cepa Girardot (Cundinamarca) en

condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura, Pontifica Universidad Javeriana.

- Cruz, A.; Montero, G.; Navarro, A. y Lorenzo, P. (2005). Control de culícidos con el empleo de *Bacillus thuringiensis* SH-14 var. *israelensis* en criaderos permanentes de la localidad de Fomento, provincial Sancti Spíritus, Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. Vol. 57 (3).
- Dahl, C.; Sahlen, C.; Grawe, J.; Johanison, A. y Ammeus, H. (1993). Differential particle uptake by larvae of three mosquito species (Díptera: Culicidae). *Journal Medic Entomology*. Vol. 30, pp. 537-543.
- Dhang, P. (2011). Urban pest management: an environmental perspective. Editorial CABI. Manila, Filipinas. Pp. 237.
- Delgado, N. (2005). Factores que afectan la eficacia y persistencia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sobre *Anopheles aquasalis* Curry (Díptera: Culicidae), vector de malaria en Venezuela. *Entomotrópica*. Vol. 20, pp. 213-233.
- Devine, G.; Eza, D.; Oigusuku, E.; Furlong, M. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista de Perú Médica de Salud Pública*. Vol. 25 (1). Pp. 74-100.
- Fernández, F. e Iannacone, J. (2005). Variaciones de tres índices larvarios de *Aedes aegypti* (L.) (Díptera: Culicidae) y su relación con los casos de dengue en Yurimaguas, Perú, 2000-2002. *Revista de Parasitología Latinoamericana*. Vol. 60, pp. 3-16.
- Figueroa, E.; Álvarez, M.; Pérez, P. y Molina, D. (2006). Mecanismos de resistencia a insecticidas organosintéticos en una población de *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae) del estado Aragua. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. Vol. 46 (1).
- Fimia, E.; Castillo, J.; Cepero, O.; Corona, E. y González, R. (2010). Eficacia del control de larvas de mosquitos (Díptera: Culicidae) con peces larvívoros en Placetas, provincia Villa Clara, Cuba. *Revista electrónica de Veterinaria*. Vol. 11 (3), pp. 1-8.

- Flores, A.; Mohammad, B. y Ponce, G (2001) Resistencia a insecticidas en insectos vectores de enfermedades con énfasis en mosquitos. *Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Vol. 2 (4).
- Flores, A.; Egúsqüiza, R.; Alcarraz, M.; Woolcott, J.; Benavides, E.; Godoy, J.; Huerta, D.; Jesus, G. y Patriño, A. (2011). Biodiversidad de *Bacillus thuringiensis* aislados de agroecosistemas peruanos y evaluación del potencial bioinsecticida. *Ciencia e Investigación*. Vol. 14 (1). Pp. 29-34.
- Fonseca, A.; Peña, G.; Trejo, A.; Lina, L.; Rodríguez, L. y Hernández, V. (2013). Patogenicidad y virulencia de cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas del estado de Morelos sobre *Diatrea magnifactella* (Lepidóptera: Crambidae). *Acta Zoológica Mexicana*. Vol. 29 (3). Pp. 534-544.
- Fonseca, I. y Quiñones, M. (2005). Resistencia a insecticidas en mosquitos (Díptera: Culicidae): mecanismos, detección y vigilancia en Salud Pública. *Revista Colombiana de Entomología*. Vol.31 (2), pp. 107-115.
- Gallegos, G.; Cepeda, M.; Aranda, E.; Tejada, L. y Enkerlin, D. (2003). Evaluación del efecto de *Bacillus thuringiensis* (berliner) sobre larvas del segundo estadio de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Agrociencia*. Vol. 37 (4). Pp. 405-411.
- Gallegos, G.; Cepeda, M.; Olayo, R.P. (2004). Entomopatógenos. 1° Edición, Ed. Trillas, México. Pp.147.
- Gato, R.; Díaz, M.; Bruzón, R.; Menéndez, Z.; González, A.; Hernández, Y. y García, I. (2008). Estudio de resistencia de *Aedes aegypti* a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. Vol 60 (1), pp. 74-77.
- Gill, S.; Cowles, E.; Pietrantonio, P. (1992). The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology*. Vol. 37, pp. 615-636.
- Gomes, U. y Costa, W. (2004). Aplicación de formulaciones de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* SH-14 contra *Aedes (S) aegypti*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. Vol. 56 (3), pp. 163.

- Huerta, D.V. (2013). Caracterización molecular de cepas de *Bacillus thuringiensis* con propiedades entomocidas, para vectores transmisores de enfermedades metaxénicas (dengue). Tesis de doctorado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Ibáñez, S.; Martínez, C. (1994). Clave para la identificación de larvas de mosquitos comunes en las áreas urbanas y suburbanas de la República Mexicana (Díptera: Culicidae). *Folia Entomología Mexicana*. Vol. 92, pp. 43-73.
- International Society for Infectious Diseases (2016). Fiebre amarilla en Angola: epidemia, extensión a nuevas provincias. Consultado el 17 de marzo, 2016 en: <http://www.isid.org/>
- Investigación y Ciencia. Prensa Científica, S.A. Barcelona, España. Consultado el 20 de febrero, 2016 en: <http://www.investigacionyciencia.es/paginas/contacto-10502>
- Jiménez, A. (2012). Los arbovirus emergentes y el cambio global. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid, España. Pp 25.
- Lee, Y. y Zairi, J. (2005). Laboratory evaluation of *Bacillus thuringiensis* H-14 against *Aedes aegypti*. *Revista Tropical Biomédica*. Vol. 22, pp. 5-10.
- Lonc, E.; Doroszkiewicz, W.; Klowden, MJ.; Rydzanicz, K. y Galgan, A. (2001). Entomopathogenic activities of environmental isolates of *Bacillus thuringiensis* against dipteran larvae. *Journal Vector Ecology*. Vol. 26 (1), pp. 15-20.
- Mancebo, A.; González, B.; Riera, L.; Lugo, S.; González, Y.; Arteaga, ME. Y Fuentes, D. (2003). Evaluación de la toxicidad/patogenicidad de una formulación de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bactivec). *Revista de toxicología*. Vol. 20, pp. 204-209.
- Marquetti, C.; González, D.; Aguilera, L. y Navarro, A. (2000). Abundancia proporcional de culícidos en el ecosistema urbano de Ciudad de La Habana. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. Vol. 51 (3), pp. 181-184.

- Miranda, R.; Fonseca, V.; Lora, I.; Soto, G y Miranda, S. (2003). Resultados del BACTIVEC en la campaña anti *Aedes aegypti* en Santiago de Cuba durante el 2003. *MEDISAN*. Vol. 7 (4), pp. 14-19.
- Mosquito Taxonomic Inventory (2008). Consultado el 23 de marzo, 2016 en: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>.
- Mulle, R. y Duden, L. (2002). *Medical and Veterinary Entomology*. Academic Press. 1° Edition, pp. 597.
- Neglected tropical diseases, OMS. (2016). WHO vector control advisory group emergency meeting deliberates vector control tools. Consultado el 27 de marzo, 2016 en: http://www.who.int/neglected_diseases/news/vcag_emergency_meeting_deliberates_vector_control_tools/en/
- Nicholls, C. (2008). *Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico*. 1° edición. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia. Colombia. Pp. 294.
- Ochoa, G. y Arrivillaga, J. (2009). *Bacillus thuringiensis: avances y perspectivas en el control biológico de Aedes aegypti*. *Boletín de malariología y salud ambiental*. Vol. 49 (2).
- Organización Mundial de la Salud. (2015). Alerta Epidemiológica. Infección por virus Zika. Consultado el 25 de mayo de 2016: <http://www.paho.org/hq/>
- Organización Mundial de la Salud. (2015). Programa: Lucha contra el dengue. Consultado el 18 de abril de 2016 en: <http://www.who.int/denguecontrol/es/>
- Organización Mundial de la Salud (2016). Enfermedades transmitidas por vector. Nota No. 387. Consultado el 7 de marzo de 2016 en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/es/>
- Ponce, G.; Flores, A.; Badii, M.; Fernández, I.; González, T.; Rodríguez, M.; Chiu, J. (2003). Evaluación de *Bacillus thuringiensis israelensis* sobre la población larval de *Aedes aegypti* en el área metropolitana de Monterrey N.L. México. *Revista Salud Pública y Nutrición*. Vol. 4 (3).

- Reyes, J. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* con actividad mosquitocida nativas de Oaxaca. Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional.
- Rodríguez, A. y Arredondo B. (2007). Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. *Folleto técnico. Vol. 1* (23), pp. 303.
- Rojas, E. (2008). Caracterización de criaderos de *Anopheles spp.* Del Noroccidente de Venezuela. Centro "José Witremundo Torrealba" Universidad de Los Andes.
- Rosales, T.; Salcedo, R.; Ibarra, E.; Barboza, J.; Eleazar, J. (2003). Identificación de los Genes cry en Cepas Mexicanas de *Bacillus thuringiensis* con potencial insecticida. *Acta universitaria, Universidad de Guanajuato. Vol. 13* (2). Pp. 39-46.
- Ruiz, S. y Cáceres, F. (2004). Bases técnicas para el control de mosquitos culícidos en los arrozales de la Comarca de La Janda, Cádiz (SW España). *Bol. San. Veg. Plagas. Vol. 30*, pp. 753-762.
- Russell, T.; Brown, M.; Purdie, D.; Ryan, P. y Kay, B. (2003). Efficacy of VectoBac (*Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*) formulations for mosquito control in Australia. *Journal of Economic Entomology. Vol. 96* (6), pp. 1786-1791.
- Sansinenea, E.; Rojas, N.; Anastacio, E.; Sánchez, P.; Vázquez, C.; Zumaquero, J. y Negrete, E. (2004). δ -Endotoxina de *Bacillus thuringiensis*: una proteína insecticida específica. En R., Rocha; P., Lozano; Y., Martínez. (Eds.). *Mecanismos de patogenicidad e interacción parásito hospedero.* (pp. 213-232). Puebla, México. Derechos reservados© Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Sauka, D. y Benintende, G. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología. Vol. 40*, pp. 124-140.
- Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D. y Dean, D. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal

proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 62(3), pp. 775-806.

- Secretaria de Salud (1995). Programa de contingencia para enfrentar el Dengue y Dengue Hemorrágico en México.
- StatPoint Technologies. (2010). Statgraphics Centurion XVI. Software estadístico versión en español. United States.
- Stein, M.; Oria, G. y Almirón, W. (2002). Principales criaderos para *Aedes aegypti* y culícidos asociados, Argentina. *Revista Saúde Pública*. Vol. 36 (5), pp. 627-630.
- Suárez, S.; Rodríguez, J.; Menéndez, Z.; Montana, D.; García, I. y Marquetti, M. (2005). *Macrocyclops albidus* (Copepoda: Cyclopidae): una nueva alternativa para el control de larvas de mosquito en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. Vol. 57 (3), pp. 1-9.
- Tamez, G.; Wong, P.; Roldán, L.; Gutiérrez, H.; Padilla, C.; Flores, C.; Tamez, R. y Reyes, S. (2001). Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL*. Vol. 4 (2). Pp. 143-152.
- Terán, M.; Rodríguez, M.; Leyva, Y. y Bisset, J. (2014). Evaluación de temefos y pyriproxifeno en *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) de Guayaquil, Ecuador. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. Vol. 66 (1).
- Thirión, I. (2002). *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) como transmisor del dengue en México. Tesis de licenciatura, UNAM.
- Thirión, I. (2010). El mosquito *Aedes aegypti* y el Dengue en México. Bayer Environmental Science. México, pp. 151.
- Writter, S.H. (1979). An assessment of future technological advances in agriculture and their impact on the regulatory environment. *Critical food of the eighties*. Nueva York, Oxford.