

24. 72A



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

SITUACION Y PERSPECTIVAS DE
Bacillus sphaericus EN MEXICO



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
NORMA MORALES GUTIERREZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1989



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

SITUACION Y PERSPECTIVAS DE *Bacillus sphaericus* EN MEXICO

I N D I C E

1.	INTRODUCCION.	6
2.	GENERALIDADES.	8
2.1	Importancia.	8
2.2	Origen.	9
2.3	Distribución geográfica natural.	9
2.3.1	Acción patógena.	10
2.4	Taxonomía y características.	11
2.4.1	Generalidades de la familia Bacillaceae.	11
2.4.2	Clasificación Bioquímica de <i>B. sphaericus</i>	12
2.4.3	Comentarios.	13
3.	CONTROL DE ORGANISMOS BLANCO.	15
3.1	Plagas de importancia.	15
3.2	Enfermedades que causan.	17
3.2.1	Paludismo.	17
3.2.2.0	Dengue.	20
3.2.2.1	Dengue hemorrágico.	20
3.2.3	Encefalitis equina del Este.	22
3.2.4	Encefalitis equina del Oeste.	24
3.2.5	Encefalitis equina venezolana.	26
3.2.6	Fiebre amarilla.	28
3.2.7	Fiebre por el grupo C de Bunyavirus.	30
3.3	Seguridad.	32
3.3.1	Invertebrados y vertebrados de sangre fría.	32
3.3.2	Vertebrados isotermos.	32
4.	PRODUCCION DE <i>Bacillus sphaericus</i>	36
4.1	En laboratorio.	36
4.1.1	En campo.	40

4.2	Condiciones del proceso.	41
4.2.1	En laboratorio.	41
4.2.2	En campo.	41
4.3	Tratamiento de la muestra fermentada.	42
4.3.1	En laboratorio.	42
4.3.2	En campo.	42
4.4	Pruebas de estabilidad.	44
4.4.1	Influencia del calentamiento.	44
4.4.2	Acción de los rayos ultravioleta.	45
4.4.3	Influencia del almacenaje.	45
4.5	Potencia.	46
4.6	Formulaciones y especificaciones.	48
4.6.1	Presentación.	50
5.	SITUACION MERCADOLOGICA NACIONAL.	51
5.1	Clase de consumidores.	51
5.2	Clientes potenciales.	52
5.3	Factores que atraen al consumidor.	52
5.4	Demanda.	63
5.5	Oferta, marcas registradas.	63
5.6	Comercialización.	63
6.	PERSPECTIVAS DE <i>Bacillus sphaericus</i> EN MEXICO.	64
6.1	Centros de investigación en México.	66
6.2	Ventajas y desventajas de <i>B. sphaericus</i> respecto a otros controles.	66
6.2.1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	66
6.2.2	<i>Vavraia culisis</i>	67
6.2.3	<i>Nosema algerae</i>	68
6.2.4	<i>Romanomermis</i> sp.	68
6.2.5	<i>Dugesia dorotocephala</i>	69
6.2.6	<i>Lambornella clarki</i>	70
6.2.7	<i>Gambusia affinis</i>	70
6.2.8	<i>Nothobranchius</i> sp.	70
6.2.9	<i>Romanomermis culicivorax</i>	71
6.2.10	<i>Octomyomermis muspratti</i>	71
6.2.11	<i>Lagenidium giganteum</i>	72
6.2.12	<i>Entomofthora destruens</i>	73
6.2.13	<i>Metarhizium anisopliae</i>	73
6.2.14	<i>Coelomomyces opifexi</i>	74
6.2.15	<i>Culicinomyces clavosporus</i>	74
6.3	Presente y futuro de <i>B. sphaericus</i>	75

7.	ALTERNATIVAS PARA MEJORAR EL POTENCIAL DE <i>B. sphaericus</i> .	76
7.1	Mejoramiento genético.	76
7.1.1	Generación de fragmentos de ADN.	76
7.1.2	Unión de fragmentos de ADN.	80
7.1.3	Transformación.	84
7.1.4	Plásmidos como vehículos en <i>E. coli</i> .	84
7.2	Ingeniería Genética en <i>B. sphaericus</i> .	86
7.3	Mezclas.	86
7.4	Formulaciones especiales	87
8.	CONCLUSIONES.	88
9.	BIBLIOGRAFIA.	90

I. INTRODUCCION.

Las primeras referencias al empleo de insecticidas datan de hace 3.000 años, en las escrituras de los griegos, romanos y chinos. Ya que desde entonces los insectos representaron un verdadero problema a las cosechas y a los hombres mismos; transmitiendo enfermedades que llegaron a convertirse en epidemias. (42)

Tal fue el caso del paludismo, la fiebre amarilla, la filariasis, la peste bubónica, la fiebre del tifo, encefalitis, dengue, etc.

La malaria, en una ocasión sumó 200 millones de casos y 200 millones de defunciones al año.

Una picadura de insecto favorece la penetración de organismos patógenos en la piel, que producen infecciones graves. Además algunas abejas, (como la abeja africana) y avispas, causan dolor e hinchazón. Personas alérgicas pueden llegar a morir a causa de una picadura.

La popularidad de las zonas recreativas puede ser afectada por la presencia de mosquitos, y otras plagas molestas. Una epidemia difundida por estos insectos, puede ocasionar en una zona de recreo, la cancelación en masa de las reservaciones, con las consecuentes pérdidas económicas.

En México, como en muchos otros países, el control de los insectos se ha venido haciendo, principalmente, por medio de insecticidas químicos, con el consecuente desequilibrio ecológico. (27,31,34)

Así pues una buena opción para esta necesidad, lo representan los insecticidas microbianos.

El control microbiológico de insectos se puede definir como la utilización de microorganismos efectuada por el hombre con objeto de controlar otras especies.

Los insecticidas bacterianos encabezan la cuarta generación de insecticidas. Abriendo nuevas perspectivas de producción y sobre todo, mayor seguridad a la humanidad por su inocuidad y protección al medio ambiente. (46)

Dada la importancia que actualmente representan las opciones del uso de controles naturales, dentro de la biotecnología se abre una nueva etapa en el desarrollo tecnológico mundial, no se puede ser apático ante estas situaciones; y menos aún, si pueden ofrecernos soluciones aplicables a nuestro contexto nacional.

Así pues, el objetivo de este proyecto es analizar la

situación de *B. sphaericus* y sus perspectivas de aplicación en México, tratando de dar una visión lo más amplia posible.

Analizando las diferentes formas de producción, tipo de plagas que ataca y por que; cuales son los problemas técnicos que actualmente se presentan; a quien va dirigido el producto y finalmente que instituciones nacionales se están encargando de investigar a este microorganismo; y que posibles mejoras se están estudiando mundialmente para perfeccionarlo.

situación de *B. sphaericus* y sus perspectivas de aplicación en México, tratando de dar una visión lo más amplia posible.

Analizando las diferentes formas de producción, tipo de plagas que ataca y por que; cuales son los problemas técnicos que actualmente se presentan; a quien va dirigido el producto y finalmente que instituciones nacionales se estan encargando de investigar a este microorganismo; y que posibles mejoras se estan estudiando mundialmente para perfeccionarlo.

2. GENERALIDADES.

2.1 Importancia.

Los mosquitos son vectores de enfermedades como malaria, filariasis, fiebre Rift Valley, dengue, fiebre amarilla y encefalitis, estas han incrementado la dificultad para su control, debido particularmente al desarrollo de resistencia a insecticidas químicos. (18,22,25,27,34)

La reducción de eficiencia a los insecticidas es debido a:

- a) La resistencia en los vectores de importancia para la salud pública, a nivel mundial, a los agentes químicos como DDT, HCH y dieldrin.
- b) Evidencia de un incremento de resistencia a insecticidas desarrollados recientemente como carbamatos y compuestos organofosforados.
- c) La falta de interés en la industria química para financiar la investigación y desarrollo de insecticidas, así mismo
- d) La incapacidad de algunos gobiernos para ajustar el costo de los insecticidas, especialmente en países subdesarrollados.

Otro factor primordial en la baja eficacia de los insecticidas, es la falta de almacenaje adecuado para pesticidas químicos en algunos países, especialmente en áreas rurales y remotas donde hay altas temperaturas que tienden a deteriorar las formulaciones. El peligro de su mal uso, la sobreexposición y la falta de experiencia para el mezclado y niveles de aplicación es factor siempre presente en muchas áreas periféricas requiriendo controles continuos de vectores endémicos de enfermedades. (29)

Cuando la eficiencia de un agente químico baja, la primera tendencia es incrementar la dosis lo cual incrementa los costos de operación, pero frecuentemente una seria consecuencia, es la contaminación en el medio ambiente, particularmente en las superficies del agua con la subsecuente aparición del efecto de pesticidas residuales en especies consideradas como no-objetivo.

El incremento de precio asociado con el desenfrenado costo de los energéticos y la inflación mundial, manejan el costo de las formulaciones de insecticidas a niveles excesivos, que muchos países y comunidades no pueden pagar. Lo mismo se aplica para una gran extensión de costos, así como, de equipo y labor.

Así, parece imperativo y lógico que sea utilizada una alternativa biológica integrada a los sistemas de control.

Entre las alternativas más promisorias, contra los mosquitos vectores de enfermedades se encuentran dos larvicidas bacilares, *B. sphaericus* 1593, y *B. thuringiensis* serotipo H-14. (22,28,29,30)

Cultivos de *B. sphaericus* 1593 y *B. thuringiensis* H-14 obtenidos en instituciones privadas e industriales, son investigados sobre larvas de mosquitos, evaluando especialmente velocidad de crecimiento y toxicidad.

Dentro de la especie de *B. sphaericus* se destacan por su actividad de insecticidas las cepas: SSII-1, 1593 y 2362. (54,55)

2.2 ORIGEN DEL BACILO.

Las cepas que destacan actualmente fueron aisladas por iniciativa de la WHO en el año de 1967, de insectos de importancia médica.

La primera cepa patógena para larvas de mosquitos de *B. sphaericus*, la variedad "K" (1965-1), fue aislada de larvas infectadas del cuarto estadio de *Culiseta incidens* en California, Estados Unidos.

La cepa SSII-1 se aisló de *Culex fatigans* en la India; y en Indonesia se aisló la 1593 de *Culex fatigans*.

La cepa de *Bacillus sphaericus* 1593 fue aislada de larvas enfermas de *Culex quinquefasciatus* recogidas en drenajes contaminados en Rawasari, Jakarta, Indonesia en junio de 1974. (21)

2.3 Distribución Geográfica Natural.

Dentro del género *Bacillus sphaericus* existen variedades entomotóxicas y no entomotóxicas. Las cepas no patógenas son microorganismos ubicuos encontrados por doquier en suelos y sistemas suelo-acuático.

Las cepas patógenas han sido hasta ahora aisladas sólo de larvas de mosquitos enfermos. (26)

2.3.1 Acción patógena.

En general, existen cuatro formas por las cuales los bioinsecticidas, ejercen su efecto letal, siendo estas las siguientes:

1. Infección oral; en la cual el microorganismo se ingiere con el alimento.
2. La invasión a través del integumento íntegro o tráquea.
3. Invasión parenteral. La mayoría de los microorganismos pueden invadir cuando ocurre un trauma al integumento, en general como resultado de mordedura o lesión por parte de algún insecto parásito en oviposición.
4. Ya sea adentro o por encima, es muy común el paso a través del huevo.

En el caso de *Bacillus sphaericus* la infección ocurre por vía oral; de manera que cuando la larva ingiere la bacteria en forma esporulada o vegetativa también ingiere la toxina, la cual actuará en la membrana peritrófica destruyéndola poco a poco. (41)

Los primeros signos de intoxicación, empiezan después de 30 minutos del contacto. El primer signo consiste en la perturbación del flujo de alimento en el canal alimentario, seguido por una hipertrofia o una hinchazón de las células de la parte posterior del intestino medio.

La toxina atraviesa la membrana celular, pudiendo así afectar a las células que cubren el intestino.

Algunas vacuolas invaden las células del intestino medio como al principio de la intoxicación.

Conforme la infección avanza los lisozomas aparecen en el ápice de la célula, ya que ocurre una explosión, seguida de un derrame de material citoplasmático, dentro del espacio ectoperitrófico.

Así las células aparecen degeneradas por la fragmentación del citoplasma. Sin embargo el núcleo parece tener apariencia normal.

Se sabe que aproximadamente en 10 minutos la larva detiene su proceso de alimentación, a los 30 minutos presenta una

hinchazón del intestino seguido de temblor, estremecimiento, inactividad y finalmente la muerte en un lapso de 8 a 12 horas. (33,46)

Este bacilo tiene localizadas la toxina tanto en la pared celular como en la espora. En el caso de la cepa SB11-1 su toxina la forma antes de la esporulación y es muy inestable; en cambio, en la cepa 1593 la toxina está asociada a la esporulación y es estable.

Se considera que la toxina de ambas cepas es muy difícil de remover de la célula vegetativa y/o espora, las cuales se consideran cuantitativa y cualitativamente diferentes.

En el caso de la especie 2362 produce la proteína cristalina en la paraespora (41); En organismos acuáticos como anfibios, crustáceos y peces, los resultados han sido negativos en cuanto a toxicidad. En el hombre no se han registrado casos de intoxicación. (21,56)

2.4 Taxonomía y Características.

2.4.1 Generalidades de la familia Bacillaceae.

Reino: Procaryotae
División II. Bacteria

No producen micelio. Forman endoesporas, las cuales difieren de las células vegetativas. Las endoesporas son más refractivas y poco susceptibles a la tinción, presentan gran resistencia al calor y otros agentes destructivos; contienen ácido dipicolínico (5-15% en peso seco).

La espora contiene una célula central, la cual se encuentra enclaustrada por una corteza de peptidoglicanos y cubriendo la espora una corteza exterior.

Son aerobios o anaerobios facultativos, forman cadenas y son catalasa positivos en muchas especies.

Las células miden de 1.2 - 7.0 micras. No presentan movilidad, en caso de presentarla, lo hacen típicamente por un flagelo lateral. No forman más de un esporangio por célula.

La esporulación no es reprimida por exposición al aire.

Reacción al Gram: variable. Positiva solamente en las primeras fases de crecimiento o negativa.

Quimiorganotrofos, metabólico estrictamente respiratorio, estrictamente fermentativo o ambos, usando varios sustratos. El aceptor final de electrones en la respiración metabólica es el oxígeno molecular, reemplazable en algunas especies por nitrato.

Las especies del género *Bacillus* se dividen arbitrariamente en dos grupos.

El primero, al cual pertenece *B. sphaericus*, comprende 22 especies, y el segundo que comprende 26 especies. (9,21)

2.4.2 Características Bioquímicas y Fisiológicas de *B. sphaericus*

Bacillus sphaericus Neide, cepa 1593
WHO/CCBC número de acceso 1593 (1974-2)

Dimensiones de la célula:	bastoncillos rectos ancho 0.6-1 micras largo 1.5-5 micras
Forma de la spora:	esférica o muy cercana a . Deforma poco el cuerpo bacilar no forma cuerpo paraesporal posición terminal.
Productos a partir de la glucosa:	ácido negativo gas negativo acetolna negativo
Catalasa positivo	
Dihidroxiacetona negativo	
Gram variable	
Movilidad positiva	
Temperatura de crecimiento :	máxima 30 - 45 °C mínima 5 - 15 °C
Formación de ácido a partir de:	arabinosa negativo xilosa negativo manitol negativo
Hidrólisis del almidón :	negativo
Crecimiento en :	agar anaerobico (-) 0.001% lisina (diferente) 7% de NaCl (diferente) Caldo dextrosa Sabourand y/o agar (diferente)

Producción de: reacción alcalina en caldo V-P (+)
indol negativo
NO₂⁻ a NO₃⁻

Descomposición de: caseína diferente
tirosina negativo
desaminación de fenilalanina positivo

Crece en varios medios nutritivos, de diferentes formas: compactas, amontonadas a lo ancho y extendiéndose sobre la superficie. Raramente producen colonias rosas.

La acción proteolítica de la gelatina nutritiva (32°C) y leche tornasolada muestra degradación obvia por siete días y nunca en tres semanas.

El crecimiento puede ser reportado en caseína hidrolisada. Algunos géneros requieren la adición de tiamina y biotina. El crecimiento en medio complejo no es promovido por amonio o urea.

Aeróbico en todos los medios. Las esporas se encuentran en el suelo.

El contenido de gúanina y citosina del DNA reportado para dos géneros es 37% moles y 43% moles, en los géneros ATCC 14577; NCIB 9370; NCTC 10338 (9,21,26,40,56)

2.4.3 Comentarios

El límite entre estas especies es difuso y arbitrario. Se han encontrado cinco grupos genéticamente distintos dentro del *B. sphaericus* por estudios de homología del DNA. El grupo II está subdividido en dos subgrupos: IIB y IIA; el último contiene cepas que son patógenas para mosquitos (incluyendo la cepa 1593).

Todas las cepas en el subgrupo IIA tienen la capacidad para formar la enzima ureasa. Requieren para su crecimiento medios alcalinos que contengan NH₃. La forma de la espora es ligeramente oval. No crece a pH de 5 o en caldo NaCl 5%. El significado especial de los organismos del grupo de *B. sphaericus* es que éstos son los más representativos del género *Bacillus* del suelo.

Aunque la clasificación por bacteriófagos permite el reconocimiento de cuatro subgrupos entre las veinte cepas de *B. sphaericus* que son patógenas para los mosquitos, no es posible aún diferenciar cepas individuales.

La cepa 1593 de *B. sphaericus* y otras cepas patógenas son parásitos autónomos y saprófitos, para crecer requiere biotina y tiamina, así como de seis aminoácidos (leucina, valina, isoleucina, metionina, lisina y Ácido glutámico), los que sirven tanto como fuente de carbono como de nitrógeno orgánico. El microorganismo es incapaz de utilizar nitrógeno inorgánico. (9.21.26)

La cepa 1593 es muy sensible a niveles bajos (50 a 100 microgramos/ml) de penicilina y tetraciclina. No es sensible a niveles bajos de cloranfenicol ni a la estreptomycinina, aún a niveles altos; estos patrones de resistencia natural a los antibióticos son consistentes como en las bacterias Gram positivas.

Estas características nutricionales y la resistencia a niveles bajos de estreptomycinina han sido usados para la recuperación selectiva de *B. sphaericus*, en las cepas 1593 y 1321 (SS11-1) de muestras de suelo y agua tomadas de los sitios donde los microorganismos han sido usados para control de mosquitos. (39)

3. CONTROL DE ORGANISMOS BLANCO

3.1 Plagas de importancia.

Los artrópodos son, quizás, de los seres vivos el grupo más numeroso que se encuentra sobre la faz de la tierra. Aproximadamente 5 millones de especies y de 10 a 15 veces más en número que los humanos, ya que han existido muchísimo tiempo antes de la aparición del hombre. (42)

Entre los artrópodos, uno de los órdenes más importantes desde el punto de vista médico, es el de los Dípteros (dos alas), cuyos miembros se caracterizan en forma general, por presentar tamaños variables que van desde 0.5 mm hasta 5.0 cm de longitud, tener alas membranosas y dos aleríos o balancines.

Su cuerpo es delgado y fino, dividido en cabeza, torax y abdomen. Tres pares de patas que miden de 5.0 a 10.0 mm. de longitud.

En la cabeza se insertan un par de antenas filiformes constituidas por artejos articulados entre sí y un par de ojos prominentes. Poseen aparato bucal que de acuerdo con la familia de que se trate, está adaptado para picar y chupar, para lamer o succionar.

El aparato bucal de las hembras (adaptado para picar y chupar), está formado por el labio inferior, provisto de un canal en donde se insertan un par de mandíbulas y un par de maxilas dentadas, que actúan como estiletes finos con los que perforan la piel de las víctimas. En el momento de la picadura, el labro que está excavado en su cara ventral, se adosa a la hipofaringe y juntos forman un tubo por donde pasará la sangre que aspiran.

En la hipofaringe hay un pequeño canal, que permite la salida de la secreción de las glándulas salivales en el momento de la picadura, éste mecanismo tiene gran importancia, ya que es aquí, donde ocurre la transmisión de los agentes infectantes.

Los mosquitos tienen la siguiente clasificación:

Phylum : Arthropoda
Clase : Insecta
Orden : Díptera
Familia: Culicidae

La familia Culicidae se divide en tres subfamilias, de las cuales solo en Anophelinae (el gran género *Anopheles*), y Culicinae (*Theobaldia-Mansonia*, *Aedes* y *Culex*), las cuales tienen especies transmisoras de enfermedades al hombre y animales domésticos. (Ver figura 3).

FIGURA 2. DIFERENCIAS ENTRE LAS TRINIS ANOPHELENI Y CULICINI

	ANOPHELES		CULICINI	
Estado	Anopheles	Andes	Culex	
Huevos	Con flotadores. Puestos aislados en el agua.	Sin flotadores. Puestos aislados en el agua.	Con flotadores. Puestos aislados en el agua.	
Larvas	Sin sifón respiratorio. Receso paralelo a la superficie del agua.	Sifón respiratorio corto y fuerte. con penacho de pelos.	Sifón respiratorio delgado, con varios penachos de pelos.	
		Descansan en ángulo agudo en relación a la superficie del agua.		
Pupas	Mayor proporción del cuerpo en contacto con el agua. Sifón aéreo corto y acapanado. Segmentos basales del abdomen apretados a la cabeza.	Menor proporción del cuerpo en contacto con el agua. Sifón respiratorio variable.	Sifón respiratorio largo y delgado.	
		Segmentos basales del abdomen fuertemente apretados a cabeza y tórax.		
Machos	Falpos largos. Proboscis en forma de raqueta. Antenas plumosas.	Falpos más cortos que la proboscis. en la punta. Antenas plumosas.		
Hembras	Falpos más largos que la proboscis. Antenas pilosas. Escutelo redondeado y alas marcadas.	Falpos más cortos que la proboscis. Antenas pilosas.	Extremidad abdominal en punta.	Extremidad abdominal redondeada. Escutelo trilobulado.
Posición de reposo de adultos.	En ángulo recto al piso. Ángulo agudo en reposo.			Paralelos al piso.

Esta familia sufre metamorfosis completa y complicada, pasando por los estadios de huevo, larva, pupa y adulto. Las larvas son activas, las pupas son inactivas y no se alimentan.

Generalmente las hembras no pueden producir huevos fértiles sin ingerir sangre, ya que la serotonina y adrenalina de ésta, activan la hormona gonadotrópica necesaria para la ovulación.

Las hembras depositan los huevos en el agua, aunque las hembras del género *Aedes*, también pueden hacerlo sobre la tierra húmeda en donde los huevos resisten la desecación, hasta que son cubiertos por el agua.

Unos doce días después, los huevos eclosionan liberando larvas que viven en el agua. Se alimentan de bacterias, algas y detritus orgánico, y sufren cuatro mudas antes de ser pupas (estadios juveniles acuáticos), que aunque no se alimentan son muy activas. A los tres días aproximadamente, las pupas dan origen a los adultos. (12,50,59,60,61)

3.2 ENFERMEDADES QUE CAUSAN.

Los mosquitos actúan como transmisores cíclicos o mecánicos de bacterias, helmintos, protozoarios y virus que atacan al hombre, animales inferiores, y animales domésticos de alto valor comercial.

Es importante aclarar, que algunas de las enfermedades que en este capítulo se mencionan, no representan un problema en nuestro país, o no se han presentado aún. No obstante se incluyeron por que en países vecinos constituyen ya un problema declarado, y por el riesgo de contagio que esto implica, por lo cual se considera pertinente mencionarias. (10)

3.2.1 PALUDISMO.

Sinonimia: malaria, fiebre intermitente, fiebre de los pantanos, fiebre palustre.

El paludismo es una parasitosis, caracterizada por episodios febriles típicos de acuerdo a la especie de *Plasmodium* infectante. Precedidos por escalofrío intenso, que termina con diaforesis.

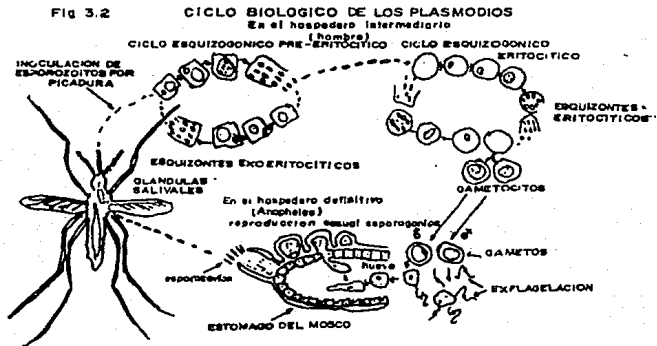
Cursa con hepatoesplenomegalia y anemia que varía de leves a graves. Aunque generalmente el paludismo es un proceso agudo, puede tener evolución crónica.

Existen cuatro especies de *Plasmodium* que parasitan exclusivamente al hombre: *P. vivax*, *P. malariae*, *P. falciparum* y *P. ovale*.

El hombre actúa como reservorio y huésped intermediario por desarrollarse en él, la fase asexual o esquizogónica del ciclo biológico de estos protozoos.

En cambio el mosquito constituye el huésped definitivo, ya que en él se llevará cabo la reproducción sexual del plasmodio.

En la figura 3.2 se muestra el ciclo de reproducción del plasmodio.



El paludismo en México fué introducido aparentemente, en 1519 por los conquistadores españoles. Los plasmodios del viejo Mundo encontraron excelentes vectores en los anofelinos mexicanos, iniciándose gravísimos brotes epidémicos, que además de causar gran mortaliad, coadyuvarón importantemente a la conquista.

El promedio de defunciones que ocasiona por año desde 1922 hasta 1952, se han estimado en 25,000 ocupando los primeros cuatro lugares de causa de mortaliad en México. Descendió posteriormente aunque aún se encuentra dentro de las 10 primeras, esto se debió a la creación de la Comisión Nacional de la erradicación del paludismo, en 1955.

No obstante una serie de factores han hecho que la erradicación no haya logrado el objetivo; pues incluso, no se ha podido pasar del 5° lugar (con 85,501 casos) en orden de importancia de padecimientos notificados de enfermedades transmisibles hasta 1986. (Ver figura 3.3).

Las principales causas al deterioro del programa son; fallas presupuestales, rutinización de las actividades, defectos en los estudios epidemiológicos para apoyar cambios de estrategia a la resistencia de los vectores, a los insecticidas convencionales, y a los factores sociales. Como migraciones, subdesarrollo económico y educación sanitaria insuficiente. (59)

Los transmisores del paludismo son hembras de *Anopheles*. En México los vectores mas importantes son:

- A. quadrimaculatus*
- A. pseudopunctipennis*
- A. aquasalis*
- A. albimanus*

Distribución geográfica: En México, los estados prioritarios son: Chiapas, Oaxaca, Sinaloa, Michoacan, Tabasco, Colima, Veracruz, Morelos, Campeche, Guerrero, Quintana Roo, Nayarit, Puebla y Yucatan. (1,12,50,54,59,61)

Figura 3.3



3.2.2.0 DENGUE

Sinonimia: fiebre rompehuesos.

Los agentes causales del dengue son *Flavivirus*, reconociéndose cuando menos cuatro serotipos 1, 2, 3 y 4, los cuales son transmitidos por los mosquitos *Aedes*.

El reservorio natural de la infección es el hombre, aunque en Malasia se ha descrito un ciclo selvático mono-mosquito.

El mosquito, después de haberse alimentado con la sangre de un sujeto víremico, se vuelve infectante en un plazo de 8 a 11 días y continúa siéndolo por el resto de su vida.

Esta infección no se transmite directamente de una persona a otra.

El periodo de incubación varía entre 3 a 15 días, (por lo regular es de 5 a 6). El periodo víremico de transmisibilidad comienza el día anterior al inicio, extendiéndose hasta el quinto día de la enfermedad.

El dengue clásico se caracteriza por un síndrome febril de inicio brusco, con duración aproximada de cinco a seis días, acompañado de cefalea y dolor retroorbital intenso, altrargias y mialgias.

En algunos pacientes se ha descrito un eritema generalizado precoz, aunque el exantema escalantiniforme, aparece al tercero o cuarto día del periodo febril, localizándose en el tronco, cara y extremidades. Ocasionalmente, se han descrito lesiones casi al término de la enfermedad, situadas en las extremidades inferiores, axilas y paladar.

La convalecencia se acompaña de fatiga, depresión prolongada y sensación de malestar. La letalidad observada ha sido muy baja. (17,18,54)

3.2.2.1 Dengue hemorrágico.

Este es grave y mortífero, se ha caracterizado por una respuesta inmunopatológica en cadena. Causado por el serotipo 1.

Después de unos cuantos días de fiebre alta, acompañada de anorexia, vómito, cefalea y dolores abdominales, el estado general del paciente sufre un deterioro rápido.

En los sujetos más graves, pueden aparecer signos de insuficiencia circulatoria aguda, hipotensión, piel fría y pulso débil. Se ha detectado menor incidencia en los adultos.

El dengue epidémico fué descrito en América desde hace 200 años: el serotipo 2 se aisló en la isla de Trinidad en 1952 y el tipo 3 en Puerto Rico desde 1963. En febrero de 1977, el dengue virus 1 apareció por vez primera en Jamaica causando una epidemia explosiva, que se propagó rápidamente por el caribe y la costa de América del sur. (35)

En México ocupa el llavo lugar en orden de importancia de enfermedades transmisibles.

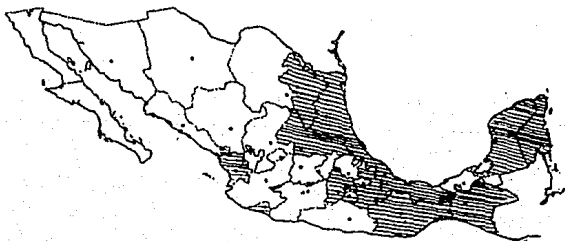
En 1977, el denguevirus 1 atacó masivamente la isla de Cuba, habiendose notificado 553,132 casos sin defunciones. Después de un periodo con pocos casos reportados, la isla es azotada nuevamente. Del 9 de junio al 10 de octubre de 1981 se registran 344,203 casos con 158 muertes, de las cuales 101 fueron en niños menores de 15 años.

El vector del dengue es *Aedes aegypti*. Este mosquito se cria dentro de recipientes en las casas o cerca de ellas, es muy antropofílico y se alimenta a la luz del día.

La fuente de infección para el mosquito es el hombre en el periodo virémico que puede durar de 5 a 6 días. Al alimentarse con la sangre del enfermo en su periodo febril, el mosquito ingiere el virus, que se multiplica en su interior e infecta sus glándulas salivares. Al cabo de unos 10 días el mosquito puede transmitir la infección a otras personas no inmunes.

Distribución geográfica: Campeche, Chiapas, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Valle de México, aunque en éste último, se han registrado muy pocos casos. En la figura 3.4 se muestran los estados afectados.

Figura 3.4



3.2.3 ENCEFALITIS EQUINA DEL ESTE.

Sinonimia: Encefalomiелitis equina del este, encefalitis del este.

Etiología: Virus de genoma ARN perteneciente al género *alphavirus* (antes grupo A de los arbovirus) de la familia *Togaviridae*.

Distribución geográfica: Se ha aislado el virus de Canadá (este), Estados Unidos (costa atlántica y del Golfo), México, Guatemala, Panamá, Colombia, Venezuela, Trinidad y Tobago, Jamaica, Cuba, República Dominicana, Haití, Guayana, Brasil, Argentina y Perú.

Ocurrencia en el hombre: La encefalitis equina del este, resulta menos frecuente que la encefalitis equina del oeste o la de San Luis, pero es más grave y altamente mortal.

La incidencia en América Central es más bien rara (o los casos no son reconocidos). Esta diferencia se atribuye a los distintos hábitos de los vectores que transmiten el virus fuera de los focos naturales. Mientras que *Aedes sollicitans* en América del Norte es antropofílico y activo a la luz del día, *Culex taeniorpus* es predominantemente selvático, de actividad crepuscular y no se introduce en las casas.

Los brotes epidémicos se producen a fines del verano; en general éstas se inician una o dos semanas antes de la aparición de casos humanos.

Los grupos de edad más afectados son los menores de 15 y los mayores de 50 años.

Ocurrencia en los animales: Se manifiesta clínicamente en équidos y en faisanes. En Panamá el brote más reciente ocurrió en 1973, y éste coincidió con una alta densidad de mosquitos *Aedes taeniorpus*.

Los últimos brotes conocidos en América Latina ocurrieron en Venezuela en 1976 y en la República Dominicana en 1978. En este último brote, se estimó que había unos 3 600 equinos infectados y que el índice de infección-mortalidad fue del orden del 34 por 1,000.

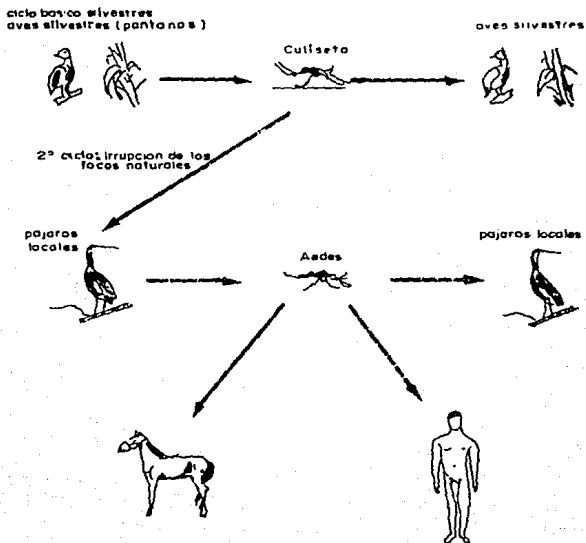
La enfermedad en el hombre: Se caracteriza por su gran letalidad (alrededor de 65% de los casos clínicos) y la alta frecuencia de secuelas permanentes en los pacientes que sobreviven.

El período de incubación dura de 7 a 10 días. La enfermedad se instala en forma súbita con fiebre, cefalalgia, conjuntivitis,

vómitos, letargia, y progresa rápidamente hacia delirio y coma.

Los signos neurológicos consisten sobre todo en rigidez de la nuca, convulsiones, espasticidad de los músculos de las extremidades y reflejos alterados. En niños es frecuente un curso bifásico, que se inicia con fiebre, vómitos y dolor de cabeza por uno o dos días; luego sigue una aparente recuperación y por último se manifiesta una encefalitis fulminante. (1)

Fig 35 Encefalitis equina del este. Ciclo de transmisión del virus



En los menores de cinco años de edad que sobreviven a la enfermedad, a menudo se observan secuelas de carácter nervioso, tales como retardo mental, convulsiones y parálisis.

Fuente de infección y modo de transmisión: El ciclo básico de la infección se desarrolla entre las aves silvestres y mosquitos. El virus ha sido aislado de la sangre de un gran número de especies de aves silvestres, tanto residentes como migratorias.

El principal vector en Estados Unidos es *Culiseta melanura*, un mosquito ornitofílico. Se ha observado que este vector se alimenta algunas veces de caballos y muy raramente sobre hombres.

En la costa atlántica se identifica como vector al *Aedes sollicitans*, un mosquito abundante en las regiones cenagosas de aguas salobres, que se alimenta tanto de sangre de aves como de equinos y del hombre. (1,19,56)

3.2.4 ENCEFALITIS EQUINA DEL OESTE.

Sinonimia: Encefalomiелitis equina del oeste, encefalitis del oeste.

Etiología: Virus del genoma ARN, perteneciente al género *Alphavirus*.

Distribución geográfica: Se ha aislado el virus en Canadá, los Estados Unidos, México, Guayana, Brasil, Argentina y Uruguay.

Ocurrencia en el hombre: Como en otras enfermedades por arbovirus, hay muchos más casos de infección inaparente que clínicos. Se ha estimado que en personas mayores de 15 años de edad ocurre un caso de encefalitis por cada 1,150 infecciones subclínicas y en niños menores de cinco años la proporción sería de 1 a 58.

Ocurrencia en los animales: En el oeste de E. U., todos los años ocurren epizootias o casos esporádicos de la enfermedad en equinos.

La enfermedad en el hombre se presenta en los meses de verano y la tasa más alta de ataque se observa en adultos jóvenes y niños menores de un año. El período de incubación dura de 5 a 10 o más días. En los adultos la enfermedad se instala bruscamente con fiebre, cefalea, rigidez en la nuca y letargia; la confusión mental es común.

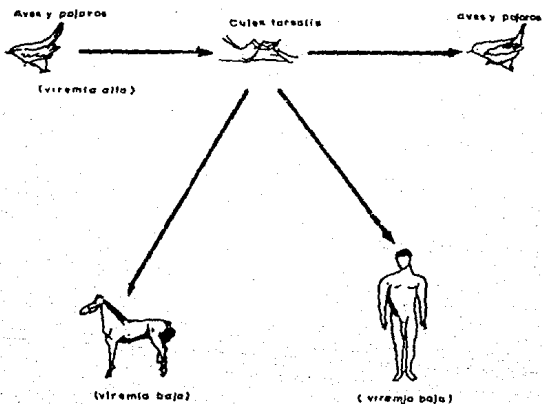
En los niños la fiebre, el dolor de cabeza y el malestar preceden por unos días a los síntomas nerviosos; las convulsiones son frecuentes, como también los vómitos, la rigidez de la nuca y el dolor de cabeza. Las parálisis flácidas y espásticas y reflejos anormales se observan con más frecuencia en niños que en adultos.

El estado febril dura de 7 a 10 días. Los pacientes adultos en general, se restablecen totalmente. Las secuelas permanentes son raras en los adultos pero frecuentes en los niños, que pueden sufrir un cambio de personalidad, retardo mental, parálisis espásticas y convulsiones recurrentes. La letalidad varía entre 3 y 4 %.

Fuente de infección y modo de transmisión: Los reservorios naturales del virus son las aves y pájaros silvestres. Al infectarse, las aves desarrollan una viremia con un título lo suficientemente alto como para infectar a los mosquitos vectores.

El vector principal en el oeste es *Culex tarsalis*, que también es el transmisor. Es probable que el *Aedes dorsalis* intervenga en la transmisión en algunas zonas donde es predominante. *Culex tarsalis*, éste se encuentra muy difundido en las áreas agrícolas irrigadas, campos de pastoreo anegados en las márgenes de los lagos. (1,19,56)

Figura 3.6. Encefalitis equina del oeste. Ciclo de transmisión del virus



3.2.5 ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA.

Sinonimia: Encefalomielitis equina venezolana, encefalitis venezolana, "peste loca".

Etiología: Virus de genoma ARN, perteneciente al género *alphavirus*.

Distribución geográfica: El virus de la encefalitis equina venezolana (EEV) es originario de las Américas y no se ha comprobado su ausencia fuera de este continente.

En la América tropical y subtropical se conocen varios focos naturales, donde las variantes antigénicas enzooticas del virus circulan entre vertebrados menores y mosquitos. Los focos enzooticos reconocidos están ubicados en Brasil, Surinam, Colombia, Panamá, y en México está localizado en Veracruz. También en Florida y centro América.

Ocurrencia en el hombre y en los animales: Desde 1938, han ocurrido muchos brotes y epizootemias de sur a norte. La mayor onda epizootémica fue la de 1969, que se difundió de Ecuador a Guatemala y se extendió a Centro América y a México, hasta que en junio de 1971 llegó a Texas. En apenas dos años se cubrió una distancia de 4,000 km y ocasionó decenas de miles de casos de enfermedad humana, con una considerable morbilidad y mortandad de equinos.

La enfermedad en el hombre: El periodo de incubación dura de dos a cinco días. La sintomatología puede variar desde una fiebre indiferenciada, similar a la de la influenza hasta casos graves de encefalitis.

En la mayoría de los casos, se caracteriza por un estado febril que se instala súbitamente, acompañado de malestar, escalofríos, mialgia, cefalalgia y con frecuencia, de náuseas, vómitos y diarrea.

Los enfermos con un curso corto de fiebre se recuperan rápida y completamente, mientras que los que tuvieron una enfermedad prolongada experimentan una marcada astenia y su convalecencia dura varias semanas.

Los signos de encefalitis son más frecuentes en niños que en adultos.

Fuente de infección y modo de transmisión: Los focos naturales de infección se encuentran en las selvas húmedas de la América tropical y en regiones casi siempre pantanosas.

Figura 3.7. Encefalitis equina venezolana. Ciclo silvestre enzootico
(virus D y E del subtipo I y los subtipos B, III, IV)
Melanoconion spp

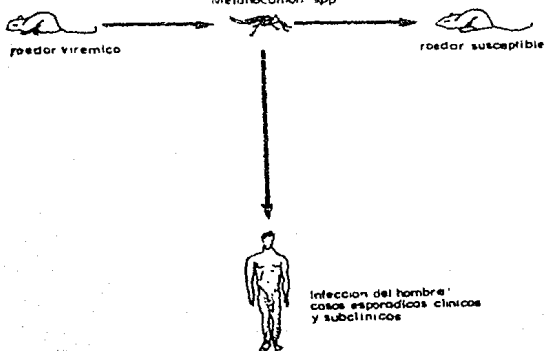
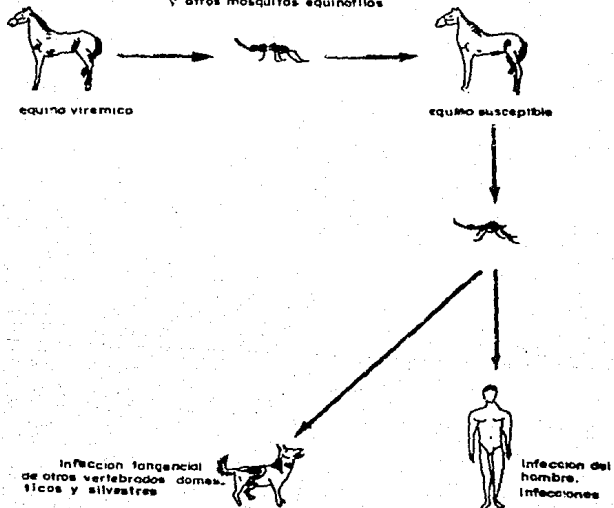


Fig 3.7. Encefalitis equina venezolana. Ciclo epizootico
(virus A, B y C del subtipo I)
Psorophora cast. ni. P. discolor Aedes sollicitans
y otros mosquitos equinofilos



El ciclo de infección se desarrolla entre roedores y marsupiales que son los principales reservorios, y mosquitos de varias especies de *Culex melanocoonion*, sobre todo *C. aikenii*, *C. episthopus* y *C. partesi*, que sirven de vectores para transmitir la infección de animales virémicos a otros susceptibles. El hombre se infecta al penetrar a los focos naturales.

Se puede afirmar que los virus epizooticos dependen de los equinos como huéspedes primarios y que la circulación del virus se efectúa por medio de mosquitos equinófilos, que transfieren la infección de un équido virémico a otro susceptible, como también al hombre y a otros vertebrados. (1.19,56)

3.2.6 FIEBRE AMARILLA.

Sinonimia: Vómito negro

Etiología: Virus de genoma ARN, género *Flavovirus*.

Distribución geográfica: La fiebre amarilla nunca se estableció fuera de África y América. En el pasado la fiebre amarilla urbana de transmisión interhumana por medio de *Aedes aegypti* había azotado a la población americana. Actualmente en las Américas está limitada a un ciclo exclusivamente selvático, mientras que en África ocurre también en áreas urbanas.

Los únicos países de América Latina donde no se han observado casos de fiebre amarilla selvática desde que se comprobó esta modalidad, son; Chile, El Salvador y Uruguay.

Ocurrencia en el hombre y en los animales: En América se notificaron 710 casos en el quinquenio de 1975 a 1980.

La mayor parte de los casos se presentan en la estación de lluvias. La fiebre amarilla urbana ha desaparecido de América, pero el peligro de epidemias de este tipo persistirá mientras no se logre la erradicación de su vector, *Aedes aegypti*, cuyo hábitat en dicho continente es doméstico y peridoméstico.

La frecuencia de la enfermedad en los simios es difícil de establecer.

La actividad del virus en las selvas se traduce con frecuencia en una alta mortalidad del mono aullador (*Alouatta*).

La enfermedad en el hombre: La infección varía desde una forma clínicamente inaparente hasta una enfermedad grave con desenlace fatal.

El periodo de incubación de la enfermedad dura de 3 a 6 días después de la picadura de un mosquito infectado.

Los casos leves presentan un cuadro clínico indefinido, los casos graves, en cambio, presentan un cuadro clínico distintivo.

La enfermedad se inicia de modo repentino, con fiebre alta, cefalea, dorsalgia, escalofríos, postración, náuseas y vómitos. La fiebre suele ser difásica; a la primera fase, que dura de 3 a 4 días, sigue un pequeño periodo en el que merma la fiebre, y luego se eleva otra vez en la segunda fase. Esta se caracteriza por insuficiencia hepática, renal, y por tendencia a hemorragias.

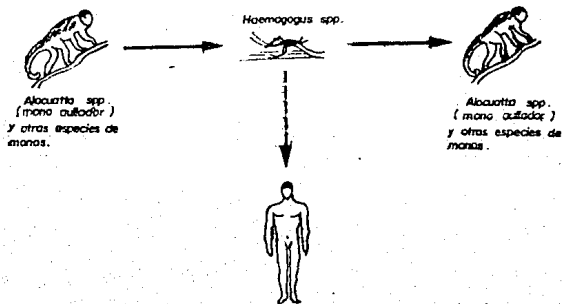
A medida que avanza la enfermedad, disminuye la frecuencia del pulso en relación con la temperatura y el paciente se vuelve hipotenso. Se presentan hemorragias bucales y gastrointestinales con vómito negro. Se manifiestan distintos grados de ictericia.

En los casos fulminantes, el paciente muere entre el tercero y séptimo día.

Fuente de infección y modo de transmisión: Ocurre en dos modalidades epidemiológicas, la urbana y la selvática. Es muy probable que la urbana se haya originado de la selvática. El único huésped conocido de la modalidad urbana es el hombre y la transmisión se efectúa por el *A. aegypti*.

El mosquito adquiere la infección (fig. 3.8) al picar al huésped durante el periodo virémico y puede transmitir la infección a otro hombre después de 10 a 12 días de incubación extrínseca. (1.19,56,59)

Figura 3.8 Fiebre amarilla selvática en las Américas. Ciclo de transmisión.



3.2.7 FIEBRE POR EL GRUPO C DE BUNYAVIRUS

Etiología: El grupo está compuesto por virus de genoma ARN del serogrupo C del género *Bunyavirus*, familia *Bunyaviridae*. En el cuadro 3.1 se presenta la clasificación de los virus del grupo C y su distribución.

Cuadro 3.1 Clasificación del grupo C de Bunyavirus.

Complejos	Virus	Subtipo	Distribución
Caraparu	Caraparu	OSSA	Panamá a Brasil
	Apeu		
	Madrid		
Marituba	Marituba	MUR RES	Trinidad a Brasil
	Nepuyo	GL	Sur de Florida (EUA) México y Centro América.
Oriboca	Oriboca		Guayana Francesa a Brasil.
	Itaqui		Brasil.

Distribución geográfica: Los virus de dicho grupo solo se han aislado en el continente Americano y estos agentes son nativos de la América tropical. La mayor parte de los aislamientos se han hecho en Panamá, Brasil. También se han notificado casos humanos por diferentes virus del grupo C en Perú, Guayana Francesa, Surinam, Trinidad, Panamá, Mesoamérica, México y Florida.

La ocurrencia en nuestro país no ha sido bien registrada, pero se sabe de su incidencia. No obstante en Brasil es donde se han notificado el mayor número de casos.

La enfermedad en el hombre: El periodo de incubación se estima en menos de dos semanas. La infección produce una fiebre indiferenciada de dos a seis días de duración.

La sintomatología consiste en pirexia, cefalea, dorsalgia y mialgias. Algunos pacientes presentan escalofríos, malestar, fotofobia, vértigo y náuseas. La recuperación es completa, pero la convalecencia puede prolongarse por varias semanas.

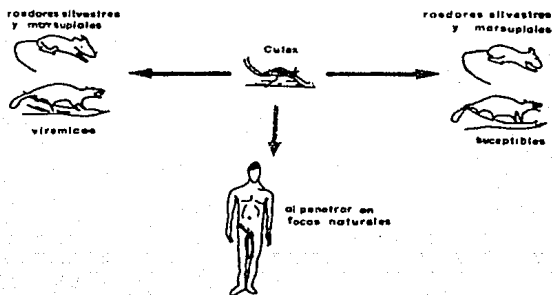
La enfermedad en los animales: El virus se ha aislado de diferentes especies de roedores, marsupiales, perezosos y murciélagos. Aunque hay viremia comprobada, la enfermedad suele ocurrir en forma asintomática.

Fuente de infección y modo de transmisión: Los reservorios son roedores y marsupiales de la selva. Los vectores son mosquitos *Culex*, sobre todo *C. (melanoconion) vomerifer* y *C. portensi*.

La viremia es de título alto en los roedores y los mosquitos se infectan fácilmente al picarlos. El virus se multiplica en los mosquitos, que transmiten la infección a otros roedores susceptibles.

El hombre es huésped accidental que se infecta por la picadura de mosquitos infectados, al penetrar en la selva por razones de trabajo. (1)

Figura 3.9. Fiebre por el grupo C de Bunyavirus. Ciclo de transmisión



La mayoría de las enfermedades mencionadas tienen como principal medida de control la erradicación del vector, ya que por tratarse, en gran parte de enfermedades víricas, no existen, en la mayoría de los casos vacunas que inmunicen a los pacientes.

Desde luego la erradicación debe ser constante, pues en cualquier momento se corre el peligro de un nuevo brote.

3.3 Seguridad

3.3.1 Invertebrados y vertebrados de sangre fría.

Durante los ensayos de campo de *B. sphaericus* 1593 en California no se detectaron efectos a concentraciones de 1×10^5 células/ml sobre los siguientes crustáceos: *Cyclops vernalis*, *Moina* sp, *Cypris* sp, *Ceriodaphnia* sp. Insectos: Empneoptera: *Callibaetis* sp. Y Dípteros: *Chironomus stigmaterrus*. (13)

Tampoco se notaron efectos colaterales en crías de pez *Gambusia affinis* durante 96 hrs en un ensayo estático usando la formulación del polvo soluble de Stauffer de *B. sphaericus* 1593 con 1×10^5 y 5×10^5 esporas/ml.

No se observaron efectos cuando se ensayaron dosis letales para mosquitos sobre organismos acuáticos como; *Gambusia*, langostinos, corixidos, náyades de damiselas, renacuajos y larvas de escarabajos depredadores.

En otra serie de ensayos no causó efectos a langostinos (*Orconectes rusticus*), peces larvívoros como el *Aphyosemion gardneri* y *Epyplatys bifasciatus*, Nepidae (hemiptera), Libellulidae (Odonata) e Libellulidae (Coleoptera).

No se encontraron efectos sobre la mosca de la fruta, la mosca negra mordedora *Simulium vittatum*, la polilla de harina *Plodia interpunctella* y el oscarabajo de los cigarros *Lasioderma serricorne*. (22,30)

3.3.2 Vertebrados isotermos.

Hay varios informes en los cuales variedades de *B. sphaericus* han sido implicadas como patógenas para animales y para el hombre. Se ha reportado un caso de meningitis y reacción generalizada Schwartzman. No se identificó la vía de entrada al paciente.

El aislado no resultó patógeno para conejos jóvenes después de infección intravenosa o intraperitoneal.

Se hizo una revisión sobre el papel de las bacterias "no patógenas" del género *Bacillus* en cuanto a producir infecciones serias al hombre. Dos casos fueron atribuidos a *B. sphaericus*.

Estudios hechos sobre patogenicidad animal, usando ratones inoculados por vía intravenosa, intraperitoneal e intracerebral. Ninguno de los animales mostró ninguna evidencia de enfermedad. (13,22,30)

Hay un único informe que atribuye seis casos de envenenamiento con alimentos, por salchichas que contenían *B. sphaericus*.

Se hicieron ensayos con bacilos de estas muestras, inyectándose a ratones y ratas en forma subcutánea, intracerebral e intraperitoneal. Se inyectaron muchos organismos viables en órganos y tejidos no expuestos ordinariamente al ambiente, lo cual ampliaría la oportunidad para que se produjeran lesiones. No resultaron ni muertes ni enfermedades clínicas de ninguna de las inyecciones.

Dosis elevadas de *B. sphaericus* pueden producir lesiones leves en el cerebro de ratas infectadas intracerebralmente, y lesiones más severas en los ojos de conejos inyectados intraocularmente.

Un componente importante de las lesiones fue resultado de la inyección de altas concentraciones de proteínas extrañas.

Las inyecciones subcutáneas e intraperitoneales fueron usualmente inócuas y ni organismos vivos que fueron autoclaveados fueron irritantes oculares.

El *B. sphaericus* 1593 fue recuperado del cerebro y ojos de 10 a 14 días después de la inyección, pero no se encontró evidencia de duplicación, lo que sugiere que los reasistamientos fueron resultado de la supervivencia prolongada de las esporas.

Resultados muy similares fueron obtenidos con aislados de los alimentos contaminados que fueron inyectados a mamíferos. Eran probablemente patógenas oportunistas al tiempo de su aislamiento y se considera muy improbable que presenten cualquier peligro para el hombre. (21,22) Ver Tabla 3.4

Se hicieron estudios de toxicidad aguda y crónica en otra serie de ensayos sobre ratas, ratones y conejillos de Indias con la cepa 1593.

Se dió a los animales comida contaminada con el bacilo, y se inyectó subcutánea, intraperitoneal o intracerebralmente. Se llevaron también a cabo estudios de inhalación y absorción cutánea. No se observó patogenicidad.

La conducta y crecimiento del animal objeto de ensayo fueron normales. No se detectaron anomalías en exámenes post-mortem. (21,22)

TAELA 1.4

ESQUEMA PRELIMINAR PARA EL DESARROLLO Y EVALUACION DE LA EFICACIA Y SEGURIDAD PARA EL CONTROL DE AGENTES BIOLÓGICOS DEL CONTROL DE ENFERMEADES POR VECTORES.

ETAPA I Laboratorio	ETAPA II: Laboratorio	ETAPA III Pruebas Prelim. de campo.	ETAPA IV Laboratorio	ETAPA V Pruebas de campo a gran escala.
A	A		A	
Identificación. Caracterización.	Pruebas de inoculación en mamíferos: Seguridad para el laboratorio y personal de campo.	REVISIÓN DE LAS ETAPAS I y II.	Pruebas de regulación supervivencia por la O.M.S. : Eficacia Vs Enfermedades por vectores en condiciones naturales.	Pruebas mas detalladas en la infectividad en mamíferos. Revisión de las etapas I - IV por un grupo informal de consulta. Bajo auspicios de la O.M.S. Hasta el momento no definidos, sufriran modificaciones dado el (los) habitat(s) del vector objetivo, modo de aplicación, etc.
B	B		B	
Evaluación contra vectores blanco.	Evaluaciones preliminares contra especies no objetivo.		Pruebas en campo y laboratorio.	
C			C	
Evaluaciones preliminares cuantitativas. (anteriores)			Estudios detallados en especies no objetivos, especialmente otra fauna del habitat para pruebas de la etapa V.	

4. PRODUCCION.

Para poder hablar de un desarrollo industrial, así como de los demás factores involucrados para asegurar un campo rentable, seguro y flexible de un agente en particular. Es necesario tener en cuenta tres aspectos importantes:

- 1) El desarrollo en términos de la tecnología de fermentación.
- 2) Formulación y distribución.
- 3) Estandarización y definición del campo de aplicación.

El *B. sphaericus* 1593 puede producirse por fermentación sumergida el cual, hasta este momento, tiene una tecnología bien desarrollada.

4.1. Fermentación en laboratorio.

Inicialmente se hicieron los estudios con la cepa SS11-1, ya que mostró tener mejor acción larvícida en el medio sintético SSM que en un medio no sintético, (BHI) o, que en el medio con material crudo (principalmente harina de pescado), llamado RAW.

Poco después, se probó con la cepa 1593, mostrando una ligera desviación de la cepa SS11-1. Los resultados se muestran en la tabla 4.1 y 4.2

Cultivos de *B. sphaericus* 1593 obtenidos de origen privado e industrial, son investigados para obtener muestras óptimas de crecimiento y toxicidad encaminada a las larvas de mosquitos.

La actividad de la LC_{50} está expresadas como la concentración logarítmica en términos de las diluciones del cultivo total final (CFT), necesaria para matar al 50% de los organismos probados. Un número grande negativo significa que se tiene un poder larvícida elevado.

El crecimiento y potencia de la cepa 1593 se logra bien en el medio SSM, que contiene vitaminas, aminoácidos, glicerol y sales minerales.

El RAW, un medio industrial barato que contiene harina de pescado, aceite de soya, vitaminas y cloruro de calcio, también es conveniente. (13,29,30,40,56)

TABLA 4.1 Comparación del crecimiento y actividad larvívica de dos cepas de *B. sphaericus* en varios medios.

Cepa	CTV (x 10 ⁶)				LC ₅₀ [log(dosis)] a			
	BHI	SSM	RM	HI	BHI	SSM	RM	HI
1593	5.0	4.1	4.2	6.7	-6.8	-7.0	-6.6	-6.9
SS11-1	4.2	3.2	4.0	6.6	-4.4	-7.1	-5.0	-6.0

a = Dilución del cultivo final que mata al 50% de las larvas provadas (*C. pipiens quinquefasciatus*) en 7 días.
 CTV = cuenta total viable.
 BHI = Infusión cerebro-corazón.
 SSM = Medio sintético Singer et.al.
 RM = Medio con material crudo 1% de harina de pescado; 0.1% carbonato de calcio; SSM vitaminas/SSM concentración.
 HI = 50% infusión de forraje.

TABLA 4.2 Comparación de la actividad insecticida de *B. sphaericus* en cultivos de larvas de *Culex pipiens quinquefasciatus* (C.p.q.) y *Anopheles albimanus* (An.a.)

Cepa	Medio	LC ₅₀ [Log(Dosis)] b	
		C.p.q.	An.a.
SS11-1	SSM	-6.5	-5.8
1404-9	SSM	-6.1	-5.8
1593-4	SSM	-7.6	-5.8
1691	SSM	-6.8	-6.2
1881	SSM	-6.2	-5.6

SSM medio sintético de Singer et.al.

b= Dilución del cultivo final que matará el 50% de las larvas en 7 días.

De estos estudios hechos en laboratorio se observó que las cepas muestran una cuenta total viable más alta en el medio BHI, no obstante el poder larvívica más alto se obtuvo con el medio SSM. De estos experimentos se dedujo también que la cepa más entomotóxica es la 1593-4 por presentar la LC₅₀ (29,30,40,47,56)

Los resultados anteriores en medios completos respecto a su potencia no pueden ser comparados adecuadamente, debido a que no se reporta como lo especifica la OMS en microgramos/ml. Lo que se puede destacar es la cuenta total viable (CTV) entre los medios completos anteriores y los medios de producción que se verán a continuación.

Investigadores de la Universidad de Nigeria, formularon cinco medios de cultivo primarios con sangre seca de vaca, sales minerales y semillas (cuatro especies de leguminosas).

Los polvos primarios obtenidos, fueron probados contra *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles gambiae*, y *Aedes aegypti*.

Fueron evaluados por crecimiento, esporulación y propiedades insecticidas utilizando como microorganismo *B. sphaericus* 1593.

En la tabla 4.3 se muestran las formulaciones de los cinco medios.

TABLA 4.3

Ingredientes	Cantidad (g/L) en cada medio*				
	medio A	medio B	medio C	medio D	medio E
Sangre de vaca	15.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Cacahuete (a)	40.0				
Frijolillo (b)		4.0			
Frijol bambara (c)		3.0	5.0	5.0	9.0
Frijol de soya (d)			9.0	3.0	
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10

a= *Arachis hipogea*

b= *Vigna unguiculata* (variedad negra)

c= *Voandzeia subterranean*

d= *Glycine soja*.

* Todos los medios fueron preparados en mas de 1000 ml con agua desionizada.

El conteo de CTV de 8.1×10^8 UFC y esporas/ml del cultivo total final del medio A y B fueron comparables a las obtenidas por Ramoska y Pacey (1979) con la cepa 1593 en un medio de cultivo que contenia extracto de levadura y glucosa; con 7.1 y 9.7×10^8 UFC/ml.

El grado de esporulación de 70-80 % de los cultivos A y B fueron también comparables a los obtenidos por Myers *et al.* en un medio nutritivo.

El poder larvicida de los cinco medios fue más efectivo contra *Culex quinquefasciatus* que con *Anopheles gambiae*, donde *Aedes aegypti* mostró ser la larva menos sensible a estos polvos primarios, estas observaciones concuerdan con lo reportado por Singer (1977, 1979), Ramoska y Pacey (1979), Ramoska *et al.* (1977), Mulligan *et al.* (1978), Ramoska - Hopkins (1981).

Las LC_{50} de polvos de *B. sphaericus* 1593 contra larvas de *Culex* y *Anopheles* expresadas en microgramos/ml como lo recomienda la OMS, no pueden ser adecuadamente comparadas con los trabajos previos donde la LC_{50} fue expresada en términos logarítmicos negativos en los valores de dilución del cultivo final total, antes mencionados (Singer 1977, 1980).

Por lo tanto, LC_{50} (microgramos de peso seco/ml) de 4.3×10^4 obtenidas de la cepa 1593 en un medio nutritivo con extracto de levadura (medio completo), contra larvas de *Culex quinquefasciatus* por Yousten *et al.* (1980) fue únicamente diez veces más potente que la cepa 1593 obtenida del medio A, industrial, ($LC_{50} = 4.344 \times 10^5$ microgramos/ml).

Las variedades de frijol antes mencionadas son muy poco conocidas en nuestro país, por lo que se recomienda sustituirlos por cacahuates, con el que se obtuvieron buenos resultados, y que sí es un material accesible. (40,43,51)

Haciendo una comparación entre la cuenta total de microorganismos viables por mililitro (CTV) en los dos tipos de medios complejos citados anteriormente se tiene lo siguiente:

Medio	CTV/ml x 10 ⁸	Medio	CTV/ml x 10 ⁸
BH1	50	A	8.1
SSM	41	B	8.6
RM	42	C	7.9
HI	67	D	7.4
		E	8.6

Así pues, la alternativa propuesta para la elaboración de medios de cultivo a nivel industrial con materiales accesibles es buena, mostrando así que existen en éstos medios, los requerimientos que el bacilo requiere para su buen crecimiento, y formación de la toxina con una potencia aceptable.

4.1.1 Producción en campo.

También está bien desarrollada la producción en pequeña escala del microorganismo con materiales proteínicos de desecho.

Previamente los resultados muestran que ambos bacilos larvicidas crecen bien en una variedad de materiales proteínicos como los polvos comerciales de productos de soya, harina de pescado, leche, sangre y suero deshidratados de una variedad de animales, también en materiales de naturaleza fecal tomados de tanques primarios de aguas residuales.

Es importante resaltar que, las especies de *bacillus* no dependen de los carbohidratos para su crecimiento, de este modo permite al medio de cultivo ser nombrado por el origen de proteína barata.

Los caldos obtenidos de residuos de carne hervida o huesos, han probado ser un buen soporte de crecimiento para la formación y desarrollo de esas toxinas sin adición de otros suplementos químicos.

Los resultados obtenidos con extractos hervidos de proteína de origen barato y aguas residuales crudas que permiten el crecimiento de los bacilos larvicidas con retención de la toxicidad hacia las larvas de mosquito, sugieren que los extractos acuosos de estiércol de animales, así como una variedad de detritus y materiales de desperdicio agrícolas, pueden proveer de un medio de cultivo adecuado.

Desde el punto de vista de algunos expertos de la OMS, el producir el larvicida bacteriano en el hábitat mismo de los mosquitos, o cerca del sitio donde se pretende utilizar, es más productivo, se propone un proyecto tipo industria "rústica" trabajando para producir el larvicida que se va a utilizar localmente bajo una supervisión técnica aprobada, usando cualquier tipo de material proteínico disponible, bien ensayado o no probado totalmente y para ser aplicado en el campo.

El inóculo utilizado puede ser un cultivo puro liofilizado, suministrado por el Ministerio de Salud del país dependiente de la OMS.

Aunque el producto obtenido puede carecer de las sofisticaciones industriales de las formulaciones producidas por una industria de fermentación, el ahorro está en el empaque, transporte y almacenaje del larvicida bacteriano .

4.2 CONDICIONES DEL PROCESO.

4.2.1 En Laboratorio.

La bacteria es estrictamente aeróbica, y necesita de una gran cantidad de aire. Los medios y condiciones de fermentación parecen tener un papel clave en la potencia, ya que existen variaciones significativas en las propiedades entomotóxicas del *B. sphaericus* cultivados en diferentes medios de cultivo y cosechado a diferentes edades.

No obstante, en estudios que se hicieron en un fermentador pequeño, tomando al aire como fuente de oxígeno, se observó que parando el flujo del aire después de 8 horas, se inhibía la terminación de la esporulación en un 50 % del cultivo total; pero no influía así en la producción de la toxina. (63)

Se ha observado que haciendo crecer la bacteria a 42 °C, se reduce drásticamente la formación de la toxina, aunque no resultan afectados ni el crecimiento ni la esporogénesis del microorganismo; por lo tanto se sugiere suspender el flujo de aire a las 8 horas de iniciado el proceso, y trabajar a temperaturas inferiores a 42 °C. (38,40)

4.2.2 En campo.

Las condiciones de fermentación para la industria "rústica", debe ser que el material prototípico para el crecimiento del bacilo, para que éste pueda ser utilizable después de someterlo al método de fındalización, o bien esterilizando en algún tipo de olla de presión.

La aereación del cultivo es estrictamente necesaria, y representa el problema mas grande en las areas apartadas.

El recipiente donde se efectuará el cultivo, deberá tener grandes dimensiones, y sobre todo adecuada para la aireación, puesto que se trata de un proceso aeróbico, y por lo tanto se requiere de algun tipo de sistema de bombeo, que puede ser un simple motor de gasolina .

Los requerimientos técnicos para una industria de producción de larvicida bacteriano "rústica", pueden ser mínimos: Las operaciones no requieren ninguna instalación especial. El inóculo, para iniciar la fermentación puede ser sustituido por polvos secos, lo cual permite prescindir de personal calificado *in situ* para supervisar la operación, basta solo con visitas regulares.

La aplicación en el campo del larvicida, no siempre requiere de un equipo sofisticado de rociado, cuando el producto puede ser dispersado simplemente con cubetas.

Así pues, se puede realizar una industria "rústica" económica y simple, utilizando los medios disponibles como desperdicios vegetales o animales, para producir cultivos primarios, y hacer factible el control de mosquitos vectores de enfermedades con técnicas muy simples. (28,29)

4.3 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA FERMENTADA.

4.3.1 En laboratorio.

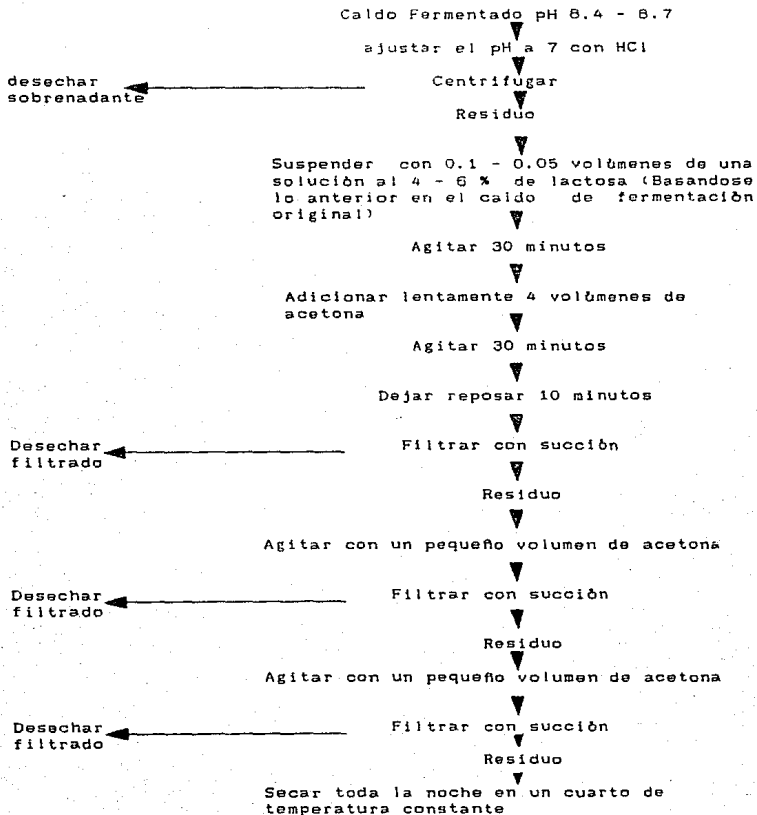
Para conseguir polvos estables del larvicida, se inicia con la aplicación de la técnica de Duimage, con un método de co-precipitación con acetona-lactosa. En la figura 4.1 se ilustra este método.

De esta manera es posible obtener pequeñas cantidades de preparaciones secas en polvo, no únicamente de la cepa 1593, sino de todas las cepas ensayadas. (46)

4.3.2 En campo.

En el caso de la industria rústica no es necesaria una extracción, ya que se puede aplicar la muestra directamente, haciendo las diluciones correspondientes, sin tener la necesidad de utilizar equipo sofisticado. (29)

Fig. 4.1 PROCESO DE RECUPERACIÓN DEL COMPLEJO "ESPORA-CRISTAL"
DE *Bacillus sphaericus*



4.4 PRUEBAS DE ESTABILIDAD.

Las esporas de *B. sphaericus* sobreviven bien en la naturaleza y parece posible que el reciclamiento ocurra en el suelo (lo que es de esperarse en un microorganismo del suelo). (21)

El *B. sphaericus* 1593 fué recuperado de muestras de suelo de un hábitat de mosquitos (zanja al lado de un camino) tratado cerca de nueve meses antes.

Las muestras profundas tenían mayor actividad larvívica que muestras de suelo superficial.

Todas los cultivos recuperados del suelo y que se demostró que eran de *B. sphaericus* retuvieron su actividad larvívica.

En Illinois EE.UU., también se hicieron ensayos en árboles con cavidades conteniendo detritos, agua y larvas de *Aedes triseriatus*, los cuales fueron tratados con suspensiones que contienen 10 mg de polvo del bacilo por litro.

Las muestras tomadas de los agujeros tratados conservaban el poder insecticida 9 meses después de un invierno severo, durante el cual, el agua se congeló en los agujeros.

Estas observaciones están en fuerte conflicto con aquellas hechas por otros autores que encontraron que el *B. sphaericus* 1593 no era efectivo contra *Aedes triseriatus*. (55)

Se han hecho varios estudios de la estabilidad de las formulaciones de los polvos de *B. sphaericus*.

4.4.1 Influencia del calentamiento.

Una suspensión de esporas, preparada a partir de un cultivo sobre gel nutritivo en frascos de Roux, de 5 días, fué calentada a 80 °C durante 12 minutos, y su toxicidad medida a las 24 y 48 horas en el curso de tres experimentos sobre unas larvas del tercer estadio de *An. stephensi*.

El resultado de estos tres experimentos es que, el calentamiento reduce la tasa de mortalidad del medio en un 60% .

El análisis de los resultados sugiere que el calentamiento no altera cualitativamente las propiedades de la toxina, sino que destruye cierta cantidad de ella.

El polvo primario Stauffer del *B. sphaericus* 1593 pudo resistir una temperatura de 70 °C durante 48 hr, aunque perdió algo de su actividad en relación con el mismo polvo mantenido a temperatura ambiente. (21,32)

4.4.2 Acción de los rayos ultravioleta.

Se sometió una suspensión bacteriana, proveniente de un gel nutritivo en frascos, de 55 horas de crecimiento a la acción de los rayos ultravioleta.

Después de irradiar 30 min. una suspensión de células vegetativas y esporuladas de *B. sphaericus* 1593, a 24 ergs/mm²/seg. mostró una actividad larvívica reducida.

A pesar del resultado obtenido a las 24 hrs. esto pone en evidencia un doble fenómeno; se observa al principio una disminución sensible de la eficiencia, hasta que la suspensión es irradiada; la tasa de mortalidad del medio baja a 65%.

La baja de actividad observada después de la irradiación concuerda con las observaciones hechas sobre la exposición a los rayos solares.

A pesar de no poder excluir una acción indirecta de los rayos ultravioleta por calentamiento de la suspensión bacteriana.

En otros estudios hechos sobre polvos, no se observó actividad larvívica después de una exposición a la luz solar directa fuera del laboratorio (en el rango de 700 - 711 lux y 22000 lux) por 5 horas sobre soluciones de 1 mg de polvo primario del bécilo, (formulación Stauffer) por litro.

En tanto que controles mantenidos en el laboratorio (en el rango de 0.7 - 1.0 lux y 7.3 lux) dieron 100 % de mortalidad en un ensayo sobre larvas de *C. quinquefasciatus*.

En hábitats con poca intensidad luminosa, probablemente, se obtendrían efectos residuales por más largo tiempo. (13,21,32,40)

4.4.3 Influencia del almacenaje.

Para determinar la influencia de las condiciones de conservación, se utilizó un cultivo de 55 horas.

Esta suspensión fue probada sobre mosquitos antes y después de su almacenamiento. Una parte en refrigeración a +4 °C durante 2 y 3 semanas; otra parte en congelación a -20 °C durante 5

semanas.

Se observó que no hay una baja sensible de actividad, cualquiera que sean las condiciones de conservación antes mencionadas.

Un decremento en la actividad fué observada en un polvo experimental mantenido por tres meses en la obscuridad a temperatura ambiente.

El *B. sphaericus* 1593 mantuvo su actividad sobre larvas de *C. quinquefasciatus* a temperaturas constantes de 10, 25 y 35 °C. pero la perdió en agua a la que no se le había agregado solución amortiguadora a pH 10.0, aunque a pH 9.2 se obtuvo 100 % de mortalidad.

La mortalidad mas alta de la bacteria se obtuvo en agua de la llave, y ésta se redujo a pH 4.3.

En otra serie de ensayos, cuando se mantuvieron suspensiones del polvo primario de Stauffer en agua, hasta por 8 días, a 25 °C bajo condiciones de luz diurna normal o en la obscuridad, la efectividad de la toxina no fué afectada por la luz del día. Pero decreció ligeramente con el tiempo. (13,14,21,32,38,40)

4.5 POTENCIA.

En un principio los científicos no estaban de acuerdo de donde se encontraba la toxina larvicida, pues los resultados obtenidos por algunos investigadores indicaban su presencia en la pared celular de las células vegetativas y otros datos indicaban su presencia en las esporas.

En lo que sí coincidieron los estudios fué que, la toxina no se encuentra soluble en el sobrenadante esto es, no la produce en forma exógena y por tanto se encuentra totalmente asociada al microorganismo. (6,8,21)

Ahora se sabe que las copas toxigénicas de *B. sphaericus* contienen un cuerpo poliédrico, comunmente conocido como un cristal, con arreglos lineales finos en la capa superficial de éste, que se repiten a intervalos de 5 nm.

El complejo proteina cristal se forma durante la esporulación y está localizado cerca de la espora, dentro del exoesporium. (36,41)

Se ha establecido una correlación entre la producción del cristal, esporulación y actividad larvicida.

Una implicación mayor de el cristal en la intoxicación larval, es la evidencia através del microscopio electrónico, que existe una rápida solubilización, cuando el complejo cristal-espora es ingerido por las larvas del mosquito.

El alcance de las investigaciones basadas dentro de la naturaleza de la toxina fué muy limitada. El principal problema fué el fracaso del aislamiento del cristal en suficiente cantidad, que permitiera la purificación de los componentes tóxicos. (8,21,35,41)

Una vez aislados éstos componentes, y parcialmente purificados por cromatografía en columna, indicó que la proteína tóxica tiene una masa molecular alrededor de 35, 55 o 100 kilodaltons (kDa).

La evidencia sugiere que las masas moleculares bajas, son derivadas de las proteínas de 100 kDa.

La disociación del complejo cristal-espora, esto es separando los cristales de las esporas por centrifugación, mostró que; la actividad larvívora más alta fué en las fracciones enriquecidas con el cristal.

Esto muestra que *B. sphaericus* es uno de los varios *Bacillus* sp entomotóxicos en los que su poder tóxico reside en el cristal. (8,21,36)

Otro punto, es el tratamiento que se le dá al cultivo final total (CFT) con diferentes disolventes orgánicos, (cloroformo, tolueno, acetona y formaldehído).

Así se encontró que, una parte de cloroformo por 10 partes de CFT disminuyen la cuenta total viable de 1×10^8 a 1×10^4 abajo del conteo de esporas.

El tolueno tiene efectos similares. La acetona tiene muy pocos efectos en cualquiera de los conteos totales viables de potencia.

El formaldehído destruye todas las células viables y esporas, así como la potencia.

Por tanto el número de células viables puede ser irrelevante para la expresión de la potencia de *B. sphaericus*; después de que las células mueren siguen conservando su poder entomotóxico.

Se ha encontrado que la potencia del insecticida aumenta cuando al medio de cultivo se le adicionan aminoácidos, ácido cis-aconítico y ácido alfa-cetoglutarico. (16,62)

La mejor expresión de actividad, puede ser una medición

química de la toxina; para que sean estandarizadas las unidades de expresión, en los polvos secos estables, o las condiciones de un líquido estandar. Ya que no existe una larva específica que funcione como estandar para la medición de la potencia como en el caso de *B. thuringiensis*. (55)

4.6 FORMULACIONES Y ESPECIFICACIONES

La formulación de un pesticida, es definida como la composición resultante del pesticida seleccionado mezclado con cualquier otra cosa, incluyendo agua.

Por lo tanto ninguna combinación de un biocida activo con un material secundario es técnicamente una formulación.

Es posible realizar formulaciones con sustitutos químicos y organismos entomopatógenos para facilitar la mezcla y aplicación del insecticida.

La definición del término formulación, puede ser dividido en las formulaciones básicas comerciales y las formulaciones de tanques mezcla.

Una formulación básica comercial está constituida por la forma y contenido de insecticida, suministro, y distribución hasta el usuario final.

Una formulación tanque mezcla, es una formulación comercial, más el vehículo; por ejemplo, agua, aceite, etc. (15)

Las formulaciones básicas de patógenos y químicos comprenden:

- 1.- Líquidos (suspensiones acuosas, o suspensiones emulsificables).
- 2.- Polvos higroscópicos.
- 3.- Lodos.
- 4.- Cebos.
- 5.- Granulados.

En la tabla 4.4 se mencionan los vehículos inertes más frecuentemente utilizados en formulaciones. (13,15)

TABLA 4.4

VEHICULOS INERTES USADOS EN FORMULACIONES BASICAS.

DILUYENTES	VEHICULOS
ARCILLAS Y LODOS	LIQUIDOS
Lodo Marble 1095	Agua
Neosil A	Emulsiones preformadas
Arena de Silica	aceite/agua
Ceolita	Emulsiones preformadas
Celitas	agua/aceite
Pyrax	Aceite mineral
Agisorb	Aceite de maiz
Arena Barden	Sorbitol crudo
Arena Kaolin	Aspersores de aceites aromaticos
Arena continental	Aspersores de aceites alifaticos
Satintone	Emulsiones de aceite de
Microcell	semilla de algod6n
Talco	
Lactosa	
Atagel	
Atarena	
Dilux	
	EMULSIFICANTES
	ATplus 300
	AL-1246
	Triton X-45
AGENTES SUSPENSORES	Triton X-363M
	AL-1260
Bentonita - 38	AL-1403
CARB-O-SIL	Atlox 3404/849
SOLIDO	Triton GR7M
	Triton X-35
	Plurafac A-24
	Triton N60
	AL- 1364
	Atlox 848
	Atlox 849
	BOTANICOS
	Pulpa de
	citricos
	Cáscaras
	de nuez
	Mazorca de
	maiz
	Salvado de
	trigo
	Cáscara de
	arroz
	Maiz que -
	brado.

4.6.1 Presentaciones.

Pequeñas cantidades de formulación de tipo comercial, en estado seco, han sido manufacturadas por Stauffer Chemical Company y por los Laboratorios Abbott.

Estas formulaciones de polvo soluble han sido usadas en varios experimentos de laboratorio y de campo, éstas son actualmente ensayadas, pero su producción no ha alcanzado la etapa comercial.

No hay especificaciones ni formulaciones estándar por el momento. La investigación de formulaciones y de medios convenientes, para alcanzar los más altos rendimientos de toxina tienen que desempeñar un papel mayor para magnificar el potencial del *B. sphaericus*. (20)

La inestabilidad y la inactividad relativa de algunas de las formulaciones ensayadas, parecen ser uno de los factores más importantes que contribuyen a la variabilidad de algunos de los resultados de los experimentos.

En los desarrollos de investigación comerciales se intenta mantener al patógeno viable y con virulencia durante los procesos de producción y desarrollo del producto, para que conserve sus propiedades. (47)

Para esto es necesario conocer la biología del patógeno y del organismo objetivo. Así como los factores del medio ambiente, como son: la humedad, temperatura y el sustrato (vehículo inerte).

5. SITUACION MERCADOLÓGICA NACIONAL

El objetivo de este capítulo es esbozar la situación mercadológica de un producto totalmente nuevo: tratando de realizar una semejanza de lo que sería lanzar a *B. sphaericus* como una alternativa a los insecticidas comúnmente usados.

Para ello se toma como base la demanda del DDT y del único bioinsecticida actualmente usado. El Thuricide o Dipel, que en nuestro país ha encontrado una buena aceptación. (45)

Aunque *B. thuringiensis* es utilizado en la agricultura únicamente, su introducción a este rubro, puede ser similar al que tendría *B. sphaericus* en el sector salud.

De aquí que se tome lo anterior como base para este estudio.

En México, a partir de 1984 se autorizó la utilización de bacterias destinadas para el control de plagas. (22)

Teniendo en cuenta que el origen de estos productos se remonta a la década de los años sesenta, cuando surge la utilización de los insectos depredadores de plagas como método para evitar su proliferación, pero no es sino hasta años después cuando se recurre al uso de microorganismos patógenos de insectos, lanzándose en 1981 a los mercados de Estados Unidos y Francia las primeras formulaciones a base de bacterias. (44)

5.1 Clase de consumidores.

Los consumidores son quienes usan (consumen) los productos y servicios, para gozar de las satisfacciones incorporadas a ellos.

Los clientes pueden clasificarse en dos grupos; los consumidores finales o domésticos, y los usuarios institucionales y de negocios.

Los diferentes tipos de clientes que compran un producto o servicio constituyen los mercados de ese producto o servicio.

Así, un mercado es simplemente un grupo de clientes con determinadas características, pudiendo agruparse en términos de como usan el producto o servicio, localización, tipo de negocios, etc. (23)

El caso que aquí nos ocupa, por el campo de acción del microorganismo se nota a primera instancia, que los principales consumidores se encuentran en las zonas costeras del país, en donde los problemas de salud son graves, por el hábitat propicio

que encuentran los mosquitos para su desarrollo.

Y por lo tanto, las zonas más afectadas por el dengue y paludismo, enfermedades que se encuentran entre los primeros 5 lugares de los principales padecimientos de enfermedades transmisibles notificados. (54)

5.2 Consumidores Potenciales.

Un consumidor potencial, generalmente lo representan, los bienes de negocio, que a su vez están formados por instituciones y dependencias gubernamentales, los cuales tienen capacidades de compra de volúmenes grandes, ya que son usados por las empresas como material o componentes de otros bienes en la prestación de servicios. (23)

Como en la Secretaría de Salud, através de la Campaña para la erradicación del Paludismo, reporta por medio de registros mensuales, como estados problema o prioritarios a: Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Puebla, Oaxaca, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán. (54)

Donde realizan hasta dos aplicaciones por año; así pues, este departamento de la Secretaría de Salud, a nivel institución, representa el consumidor potencial número uno. (50)

5.3 Factores que atraen al consumidor.

Con respecto a la toma de decisiones, se puede decir que esta compuesta por un individuo o grupo de individuos, quienes comparten una meta o metas comunes, esperando alcanzar y compartir los riesgos originados por la decisión.

Así los productos de consumo pueden diferenciarse también en términos del proceder de los compradores al adquirirlo. Dejando a los bioinsecticidas como un bien de especialidad. (22)

Los factores que modificarían en un momento dado la decisión de compra al bioinsecticida serían:

- i) La resistencia que presentan muchas especies de mosquitos a los insecticidas convencionales.
- ii) Consecuencias financieras.
- iii) La relación de los vectores resistentes y la agricultura.

iv) Y finalmente las ventajas que tiene *B. sphaericus*; inocuidad, reciclamiento, etc. (Tema tratado con detalle en el punto 6.3).

Justificando lo mencionado, se tratarán con más detalle los puntos antes enunciados.

1) Resistencia de los vectores a insecticidas convencionales.

La búsqueda de nuevos controles para los vectores de enfermedades, surge de una necesidad mundial frente a la problemática que representa la resistencia de los vectores a los plaguicidas usados convencionalmente.

Inclusive la Organización Mundial de la Salud ha formado un Comité de Expertos en Biología de los Vectores y lucha antivectorial. El cual ha editado diez informes de resistencia de vectores y reservorios de enfermedades a los plaguicidas.

En el último informe se han registrado ahora 19 especies de *Aedes* como resistentes, de las que 17 muestran resistencia al DDT y las 12 restantes a uno o más compuestos organofosforados.

Aedes aegypti ha mostrado resistencia a carbamatos y piretroides en ciertas zonas, así como al DDT y a compuestos organofosforados.

Los insecticidas organofosforados a los que por lo común se ofrece resistencia incluyen los utilizados como larvicidas o en rociamientos perifocales como malatión, fenitrotión, temefós y fentión. Ver cuadro 1. (22)

DIAPHO 1. Resistencia a los insecticidas en escudillo cultivados en países o zonas. (22)

Especies.	E.U.T.	Conquestos organofosforados.	Otros conquestos.
<i>Aedes aegypti</i> .	En casi toda parte del mundo - en que se encuentra presente - esta especie, salvo en ciertos países africanos.	Generalizada en el Caribe y - países vecinos, incluidos los sud-americanos: India, Isla Salomón, Malasia, Nueva Caledonia, Singapur, Tailandia y Viet Nam.	Granada, Guyana, Malasia, Surinam, Tailandia, E.U.A.
<i>A. albopictus</i> .	China, Namibia, Desobrátils, India, Indonesia, Japón, Malasia, Filipinas, Singapur, Tailandia, Viet Nam.	Madagascar, Malasia, Singapur, Sri Lanka, Viet Nam.	-
<i>A. atricoledus</i> .	E.U.A.	-	-
<i>A. trichodens</i> .	-	E.U.A.	-
<i>A. cantans</i> .	Checoslovaquia, Rep. Fed. de Alemania.	-	-
<i>A. cantator</i> .	Canadá.	-	-
<i>A. caspius</i> .	Kuwait, Sudán.	España, Francia, Kuwait.	-
<i>A. cetratus</i> .	Francia.	Francia.	-
<i>A. dorsalis</i> .	-	E.U.A.	-
<i>A. fijiensis</i> .	Fiji.	-	-
<i>A. asianicum</i> .	E.U.A.	E.U.A.	-
<i>A. nigrooculis</i> .	E.U.A.	E.U.A.	-
<i>A. polynesiensis</i> .	Fiji, Tahití y otras partes de la Polinesia Francesa.	-	-
<i>A. pseudoscutellaris</i> .	Fiji.	-	-
<i>A. sierrensis</i> .	E.U.A.	-	-
<i>A. sollicitans</i> .	E.U.A.	E.U.A.	-
<i>A. tseniorhynchus</i> .	Gran Cañán, Indias Occidentales Británicas.	E.U.A.	-
<i>A. togoi</i> .	República de Corea.	República de Corea.	-
<i>A. vexans</i> .	Canadá.	España, E.U.A.	-

CUADRO 1. Resistencia a los insecticidas en mosquitos culicídeos en países o zonas. (CD)

Especies.	D.D.T.	Compuestos organofosforados.	Otros compuestos.
continuación			
<i>Anopheles subulatus</i> .	Japón, Malasia, Sri Lanka.	Japón, Sri Lanka.	-
<i>Culex andersoni abyssinicus</i> .	Etiopía.	-	-
<i>C. annulirostris</i> .	-	Australia.	-
<i>C. antennatus</i> .	Egipto.	Egipto.	-
<i>C. coronator</i> .	Fanana.	-	-
<i>C. er. tritorax</i> .	E.U.A.	-	-
<i>C. fuscoccephalus</i> .	China.	China, Sri Lanka.	-
<i>C. gelidus</i> .	Bangladesh, India, Tailandia.	Sri Lanka.	-
<i>C. nigripalpus</i> .	E.U.A.	E.U.A.	-
<i>C. peus</i> .	E.U.A.	E.U.A.	-
<i>C. pipiens pallens</i> .	China, Japón, Rep. de Corea.	China, Japón, Rep. de Corea.	-
<i>C. pipiens pipiens</i> y <i>C. p. molestus</i> .	Albania, Bulgaria, Egipto, Francia, Grecia, Irak, Israel, Italia, Japón, Jordania, Kuwait, Marruecos, Rep. Araba, Siria, Rep. de Corea, Rep. Islámica del Irán, Turquía, U.R.S.S.	Egipto, España, E.U.A., Francia, Israel, Italia, Japón, Kuwait.	Egipto, Francia, Irak, Kuwait.
<i>C. scutellaris</i> .	Benin.	-	-
<i>C. pusillus</i> .	Egipto.	Egipto.	-
<i>C. quinquefasciatus</i> .	Generalmente difundido.	Australia, Bangladesh, Birma, Brasil, Camerún, China, Djibouti, E.U.A., Guinea, India, Japón, Kenya, Liberia, Madagascar, Maldivas, Rep. U. de Tanzania, Singapur, Sri Lanka, Surinam, Viet Nam.	Cacerón, Djibouti, E.U.A., India, Kenya, Liberia, Madagascar, Rep. Unida de Tanzania, Singapur, Sri Lanka, Surinam.
<i>C. restuans</i> .	E.U.A.	E.U.A.	-
<i>C. salinarius</i> .	E.U.A.	-	-
<i>C. tarsalis</i> .	E.U.A.	E.U.A.	-

CLASO 1. Resistencia a los insecticidas en mosquitos colicidos en países o zonas. (2)

Especies.	D.D.T.	Cobamestos organofosforados.	Otros cobamestos.
continuacion			
<i>C. tritaeniorhynchus</i> .	Bangladesh, Benin, China, In - dia, Japon, Nigeria, Rep. de - Corea, Tailandia.	China, India, Rep. de Corea, - Sri Lanka.	-
<i>C. univittatus</i> .	Egipto.	-	-
<i>C. vishnu</i> .	China, India.	China, Sri Lanka.	-

La Campaña de erradicación del Paludismo en México utiliza como adulticidas al DDT, Malatión y en menor frecuencia Bendiocarp y Fenitrotión. Como prevención, es decir en etapas de larva (larvicidas), Baytex y Abato. (50,61)

Veinte especies de *Culex* muestran resistencias de un tipo u otro. 19 son resistentes al DDT y 14 a compuestos organofosforados. La resistencia al DDT es generalizada en *C. quinquefasciatus*, y también puede desarrollarse resistencia a los piretroides.

Como consideraciones generales se ha venido observando una propagación de la resistencia, afectando a los programas de lucha. En ocasiones, sin embargo, es difícil separar los posibles efectos de la resistencia, de las influencias de otros factores que influyen en la lucha antivectorial, en particular las deficiencias operacionales, los cambios ambientales y otros.

La resistencia se ha extendido ahora a todas las clases de compuestos que se utilizan comúnmente; organoclorados (incluidos tanto el DDT como los grupos de dieldrin/HCH), organofosforados, carbamatos y piretroides. Hay pruebas, además, de que pudiera desarrollarse resistencia a las hormonas juveniles, al diflubenzurón, e incluso a *E. thuringensis* H-14, aunque estas pruebas provienen de estudios de laboratorio. Algunos de esos hallazgos pueden ser efectos de la resistencia cruzada a insecticidas convencionales.

La aparición de resistencia múltiple es particularmente inquietante entre vectores del paludismo y ahora se tienen registradas cinco especies importantes; *Anopheles albimanus*, *A. culicifacies*, *A. pseudopunctipennis*, *A. sacharovi* y *A. stephensi* que han mostrado resistencia en determinadas zonas geográficas.

Tales casos de resistencia múltiple se asocian a menudo con la utilización intensiva en la agricultura de un gran número de diferentes compuestos, que con frecuencia se aplican desde el aire, para combatir las plagas de cultivos comerciales como el algodón y el arroz. Ver cuadro 2.

CUADRO 2. Lista de especies y países en los que la resistencia a los insecticidas ha ejercido un efecto epidemiológico o económico y/o ha hecho necesario un cambio en las operaciones de lucha contra los vectores. (22)

Especies.	Insecticida.	País.
<i>Anopheles acoutus.</i>	D.D.T.	Indonesia.
<i>A. albimanus.</i>	D.D.T.	El Salvador, Guatemala, Haití, Honduras, México, Nicaragua, - Panamá.
	Malatión.	El Salvador, Honduras, México, Nicaragua.
	Propoxur.	El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua.
<i>A. Annularis.</i>	D.D.T.	Birmania, India, Nepal.
<i>A. arabiensis.</i>	D.D.T.	Rep. Unida de Tanzania, Sudan.
<i>A. culicifacies.</i>	D.D.T.	Afganistán, India, Nepal, Ceán Paquistán, Rep. Islámica del - Irán, Sri Lanka.
	Malatión.	India.
<i>A. gambiae.</i>	D.D.T.	Rep. Unida de Tanzania.
<i>A. maculipennis.</i>	D.D.T.	U.R.S.S.
<i>A. pharcensis.</i>	D.D.T.	Egipto.
<i>A. pseudopunctipennis.</i>	D.D.T.	México.
<i>A. pulcherrimus.</i>	D.D.T.	Afganistán, U.R.S.S.
<i>A. sacharovi.</i>	D.D.T.	Rep. Árabe Siria, Rep Islámica del Irán, U.R.S.S.
<i>A. sergentii.</i>	D.D.T.	Egipto.
<i>A. sinensis.</i>	D.D.T.	China.
	Malatión.	China.
	Fenitrotión.	China.
<i>A. stphensi.</i>	D.D.T.	Afganistán, Irán, Paquistán, - Rep. Islámica del Irán.
	Malatión.	Rep. Islámica del Irán.

CUADRO D. Lista de especies y países en los que la resistencia a los insecticidas ha ejercido un efecto epidemiológico o económico y/o ha hecho necesario un cambio en las operaciones de lucha contra los vectores. (22)

Especies.	Insecticida.	País.
continuación		
Especies molestas. Aedes. por ejemplo: A. atropalpus, A. - cantans, A. cantator, A. - castaneus, A. detritus, A. dorsalis, A. aegyptius, A. nigro scutellus, A. sierrensis, A. - sollicitans, A. taeniorhynchus A. vexans.	D.D.T. y/o varios compuestos - organofosforados.	Europa y Norteamérica.
Especies molestas, Culex. C. nigripalpus, C. peus, C. pi - piens pallens, C. p. pipiens, C. p. molestus.	D.D.T. y/o varios compuestos - organofosforados y piretroides	Varias partes del mundo.
C. quinquefasciatus.	D.D.T. y varios compuestos - organofosforados.	La mayoría de los tropicos.
C. tritaeniorhynchus.	D.D.T. y varios compuestos - organofosforados.	

ii) Consecuencias financieras de la resistencia a los insecticidas en la lucha contra los vectores del paludismo.

Hace 20 años, cuando se encontraban en su apogeo los programas de erradicación del paludismo, el DDT era barato - costaba US \$ 0.61/kg - y era escasa la resistencia que se había producido a los insecticidas.

En 1988 el aumento de costo del DDT en dolares \$ 1.70/kg, aunado a esto, la devaluación de la moneda con respecto al dolar estadounidense, y el incremento de otros costos operacionales produjeron un aumento del 75% en los gastos globales del rociamiento del interior de las viviendas con DDT de acción residual.

Ese ascenso tuvo lugar pese a la reducción del 37% en las aplicaciones del DDT a raíz de haberse desarrollado resistencia generalizada a ese compuesto. Sin embargo, los insecticidas operacionales de que se dispone en la actualidad para empleo en salud pública son más costosos que el DDT e incluyen bendiocarb, propoxur (carbamatos), HCH (un compuesto organoclorado), cloroxim, fenitrotión, malatión, metil pirimifós (compuestos organofosforados), deltametrina y permetrina (piretroides).

La resistencia en las poblaciones de vectores que dan lugar a un menor efecto de los esfuerzos por combatirlos o su fracaso completo, tiene repercusiones en los diferentes componentes socioeconómicos de una comunidad. En el extremo inferior de la gama socioeconómica, el aumento de la morbilidad da por resultado la pérdida de potencial humano y la perturbación de las actividades diarias que pueden reducir la productividad.

En las comunidades agrícolas, la productividad reducida y la pérdida subsiguiente de ingreso pueden influir en los ciclos ulteriores de cultivo.

La producción agrícola reducida de fincas individuales como resultado del deterioro gradual de la salud se considera a menudo como un problema importante por el gobierno, que requiere la aplicación de medidas preventivas y curativas, las cuales son costosas, en particular si el vector es resistente al DDT. En el cuadro 3 se comparan los costos estimados del rociamiento de acción residual con varios insecticidas para combatir los vectores del paludismo.

También se originan costos sustanciales de manera indirecta como consecuencia de la resistencia a los insecticidas además de los costos directos de los insecticidas de sustitución (por ejemplo, mayores costos de transporte, medidas de seguridad personal, mano de obra, almacenamiento y manipulación de los compuestos más peligrosos). (22)

DIFDIO D. Comparación de costos de siete insecticidas utilizados en el rociamiento con acción residual para combatir los vectores del paludismo, 1981

Año.	1981	1984	1984	1984	1984	1984	1984	1984
Insecticida.	D.D.T.	D.D.T.	Permethrin	Fenitrothion	Malatión	Ferretrina	Pirimafos - setílico.	Propoxur
Formulación (% p.p.a.)	75.00	75.00	80.00	40.00	50.00	25.00	50.00	50.00
Etiquetas (g./litro/m ²)	2.00	2.00	0.40	2.00	2.00	0.50	2.00	2.00
Dosis recomendada de efecto residual (l./ha.)	0.00	0.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Número de aplicaciones necesarias por ha.	2.00	2.00	4.70	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Costo de insecti- cida aplicado por ha. (g./m ²)	5.75	5.75	2.50	20.00	16.00	8.00	16.00	16.00
Costo del insecti- cida por litro (\$ 1.74)	0.61	1.70	25.00	2.35	2.00	14.00	6.75	11.00
Costo del insecti- cida por ha. (\$ 1/100 m ²)	0.22	0.91	7.00	4.70	3.20	11.20	10.00	17.60
Relación entre el costo del insecti- cida solo y el costo del D.D.T. en 1984.	35.00	100.00	769.00	516.00	352.00	1,231.00	1,109.00	1,935.00
Relación entre el costo de mano de obra y transporte y el costo de aplica- ción del D.D.T. en 1981.	30.00	100.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00

p.p.a. = Polvo dispersable en agua.
g./l. = Gramos de ingrediente activo.

iii) La resistencia de los vectores y la agricultura.

El 90% de todos los insecticidas producidos por la industria se emplea para fines agrícolas, y de éstos el tratamiento de los cultivos algodoneros representa la mayor proporción de los utilizados.

Los cultivos arroceros, también han necesitado tratamiento repetido e intensificado de insecticidas desde que en 1965 se introdujeron las variedades de alto rendimiento.

Los tratamientos agrícolas pueden ejercer una presión selectiva en los vectores en la etapa larval o adulta, o en ambas. Los vectores también pueden estar sometidos a presión indirecta, por ejemplo, cuando los insecticidas aplicados en la tierra son llevados por el agua de las lluvias a charcas o ríos donde proliferan los vectores, y los adultos de algunas especies también descansan sobre plantas tratadas.

Las prácticas agrícolas han sido incriminadas en el desarrollo de resistencia en los vectores cuando:

- la resistencia apareció antes de la aplicación de los insecticidas para combatir vectores específicos;
- las poblaciones de vectores se suprimieron mediante rociamientos agrícolas, pero fueron menos afectadas por la exposición subsiguiente;
- los aumentos en la resistencia coincidieron con la aplicación de insecticidas agrícolas, y
- el espectro de la resistencia cruzada guardó relación con el compuesto utilizado.

Sería erróneo formular generalizaciones cuando se considera el efecto de la agricultura en la resistencia y en el control de los vectores.

Por la razón antes mencionada muchos sistemas acuáticos se encuentran contaminados con cadenas orgánicas cloradas, y se ha encontrado que *Bacillus sphaericus* es capaz de degradarlos; pudiendo así, cumplir una doble función, matar las larvas de mosquitos, y al mismo tiempo reestablecer la ecología de ese sistema.

Pues como ya es sabido los hidrocarburos clorados, principalmente provenientes de residuos de DDT, no son biodegradables, y son a tal punto tóxicos que en muchos países se ha prohibido su uso. (5)

Otro factor importante es la inocuidad de *Bacillus sphaericus* frente a especies no objetivo, así como el reciclamiento natural del mismo. (20,22,29)

5.4 Demanda.

La demanda de un bien o servicio es, una predicción de las ventas del producto, y que tiene como fin ver a futuro el desarrollo del mismo. (23)

Si tomamos como referencia el consumo aparente del DDT, se observa que al principio de los 80's tiene un elevado consumo, iniciándose un drástico descenso en 1982, prolongándose hasta 1984, donde hace su aparición *B. thuringiensis*. Alcanzando en apenas 5 años un 2% del consumo total aparente (45). Esperando que a un mediano plazo logre introducirse más sólidamente en el mercado. (Grafica 1) (2,3,52,53)

Esperando que *B. sphaericus*, tenga una penetración similar en el mercado, podría tener una buena demanda a largo plazo.

5.5 Oferta.

Hasta el momento Stauffer Chemical Company y Laboratorios Abbott, han realizado formulaciones tanto a nivel laboratorio como de campo. (13,15,21)

Se siguen ensayando y se espera que pronto se elaboren las especificaciones y formulaciones estandar.

5.6 Comercialización.

La distribución entre compradores de bienes de consumo y de negocios, es útil debido a las diferencias en hábitos, motivos y capacidades entre estos tipos de compradores.

Estas diferencias, dictan por lo general las conveniencias de usar canales de distribución diferentes.

Mostrando para un bien especializado como lo es el bioinsecticida, sería un número comparativamente pequeño de distribuidores y vendedores directos con respecto a un bien de consumo. Para ello se hace imperativo el uso de campañas publicitarias a través de la Secretaría de Salud, y de esta manera empezar a dar a conocer el producto. (23)

En un principio la comercialización del producto puede hacerse, como en el caso del Thuricide y Dipel: ser importado por Química Henckel y los Laboratorios Abbott, para ser distribuido por los Laboratorios Helios.

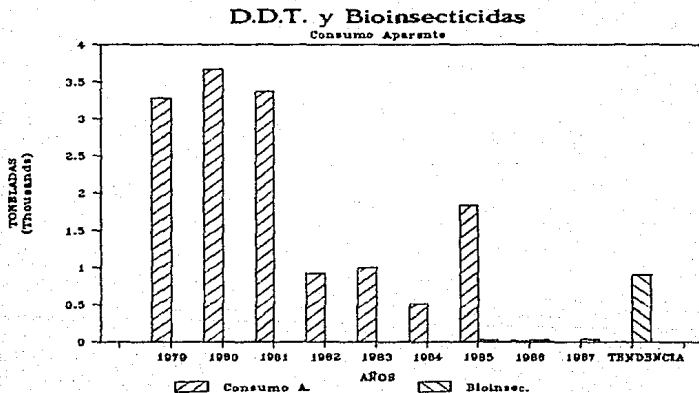
Esto mientras se instala una infraestructura nacional. En este aspecto se tienen buenas perspectivas, ya que la política actual demanda como uno de los puntos prioritarios, el sector de la investigación y el ecológico.

Por otro lado, con los antecedentes planteados en el capítulo 4, punto 4.1.2 (producción en campo) , puede iniciarse así, en el lugar donde se requiera la producción del microorganismo, evitando de esta forma canales de distribución complejos y costosos.

D.D.T. y Bioinsecticida.

AÑO	CONSUMO APARENTE. D.D.T. (Toneladas)	BIOINSECTICIDA. (Toneladas)	%
1979	3.275.00	0.00	
1980	3.670.00	0.00	
1981	3.270.00	0.00	
1982	914.00	0.00	
1983	966.00	0.00	
1984	509.00	5.09	1.0 *
1985	1.828.00	27.42	1.5 *
1986	18.00	27.42	1.5 *
1987	NO DATO	36.56	2.0 *
		900	

* Comunicacion personal.



6. PERSPECTIVAS DE *B. Sphaericus* EN MEXICO.

Al parecer las perspectivas de uso del bacilo son prometedoras, pues actualmente se está realizando su estudio para mejorar las deficiencias que hasta ahora presenta; y la investigación, no es exclusiva de un solo centro.

6.1 Centros de investigación en México.

Conforme a la recopilación hecha por la Dirección General de Institutos Tecnológicos, y , el Consejo Nacional de Educación Tecnológica; en la línea de investigación de los bioinsecticidas, las instituciones dedicadas a éste estudio son;

CINVESTAV-IPN (Depto. de Biotecnología y Bioingeniería)

Universidad Autónoma de Nuevo León, Fac. de Ciencias Biológicas.

Universidad Autónoma de Colima. Centro Universitario de Investigaciones para el Desarrollo Agropecuario. (CUIDA).

Instituto Tecnológico de Veracruz.

Instituto de Enfermedades Tropicales de la Secretaría de Salud. Area de Entomología.

En estos lugares se encuentran trabajando más arduamente en *B. thuringiensis*, no obstante en la Universidad de Colima ya se han iniciado los estudios de *B. sphaericus*, al igual que en el Instituto de Enfermedades Tropicales. (44,46)

6.2 Ventajas y desventajas de *B. sphaericus* respecto a otros controles biológicos.

6.2.1 *B. thuringiensis* H-14

La utilización de *B. thuringiensis* H-14 para combatir dípteros médicamente importantes (mosquitos y simúlidos) ha aumentado en forma sustancial durante los últimos años, aunque la aplicación de insecticidas sintéticos está todavía mucho más generalizada.

En el Programa de Lucha contra la Oncoercosis se hace uso de gran escala de *B. thuringiensis* H-14 en zonas de Africa donde el vector ha desarrollado resistencia al temefos y clorfoxim.

De manera análoga, se utiliza selectivamente en los distritos de lucha contra los mosquitos en los Estados Unidos de América, donde la resistencia a los insecticidas o las consideraciones ambientales lo hacen conveniente.

Estudios revelaron que la resistencia a *B. thuringiensis* H-14 era inestable y descendía en cerca de 50% en tres generaciones cuando no existía presión de selección. Ese descenso se relacionó con la reducción de aptitud biológica.

Las variedades seleccionadas mostraron un desarrollo larval más lento de lo normal, incluso en ausencia de *B. thuringiensis* H-14, el desarrollo se demoró todavía más en los grupos tratados.

La producción de huevos, aunque no la fertilidad de éstos, fue también más baja en las variedades seleccionadas.

Aunque no se ha generalizado el uso de *B. thuringiensis* H-14 en condiciones naturales, o no se ha hecho especialmente intensivo hasta la fecha, de todos modos es alentador señalar que hasta ahora no ha habido informes de descenso de la eficacia como resultado del desarrollo de resistencia.

Esto concuerda con la opinión ampliamente sostenida de que, debido a ciertos aspectos del comportamiento del bacilo, tendrían que ocurrir cambios poligénicos para que se desarrollara resistencia, lo cual exigiría una presión de selección prolongada y rigurosa.

Además por la falta de formulaciones adecuadas para tratar determinados hábitats, como en el agua con alto contenido de materia orgánica o cubierta extensamente de vegetación, y por la necesidad de hacer aplicaciones frecuentes, dadas estas condiciones. (21,22)

La utilización de *B. thuringiensis* H-14 para combatir mosquitos ha aumentado en forma sustancial durante los últimos años, aunque la aplicación de insecticidas químicos está todavía mucho más generalizada.

6.2.2 *Vavraria (Pleistophora) culicis*

Es un parásito obligado formador de esporas que posee un filamento polar característico. Las esporas son unicelulares y están contenidas en pansporoblastos persistentes.

El *Vavraria culicis* se transmite por vía oral y ataca mayormente el aparato digestivo de sus huéspedes.

Los mosquitos parecen no ser seriamente afectados por la presencia del parásito, aún en gran número, debido al desarrollo muy localizado de los quistes del parásito. Dentro de varias generaciones hay una alta morbilidad y baja mortalidad.

Después de la ingestión de las esporas por las larvas se observa una reducción en la aparición de adultos y una reducción en la fecundidad de los adultos. Solo cuando las larvas están muy contaminadas son capaces de tornarse en adultos infectados.

La duración de la vida de los mosquitos anofelinos hembra que son huéspedes, queda reducida, y muchos no viven lo suficiente para transmitir las enfermedades.

Para aumentar el potencial de la utilización del *V. culicis*, deben ser diseñadas formulaciones satisfactorias que aumenten la flotación a largo plazo de las esporas y magnifique los contactos entre los parásitos y las larvas de mosquitos. (21)

6.2.3 *Nosema algerae* (Vavra y Undeen 1970)

El *Nosema algerae*, un microesporidiano, es un parásito obligado de patogenicidad moderada en mosquitos.

Algunas especies de *Anopheles* parecen ser los huéspedes naturales y primarios. Con dosis moderadas de esporas, hay baja mortalidad larval, así como una reducida fecundidad y longevidad en adultos.

Estudios de campo han demostrado que se pueden obtener altas tasas de infección, pero ésta desaparece rápidamente una vez que el tratamiento cesa.

La abundancia de mosquitos no fue reducida después de la aplicación de esporas. Los factores que favorecen el uso de este parásito de patogenicidad moderada son la longevidad de las esporas, facilidad de producirlas, y la longevidad reducida de mosquitos anofelinos hembras adultas para la transmisión de enfermedades. (21)

6.2.4 *Romanomeris* sp

Es un nemátodo mermitideo, que fue originalmente aislado del *Anopheles subpictus*, en la India.

En la naturaleza, el nemátodo fué encontrado desarrollándose en el hemocele de una amplia variedad de larvas de mosquitos.

El gusano de crecimiento completo (nemátodo postparasito) emergió de una larva de cuarta etapa atravesando la cutícula, resultando la muerte del huésped larval.

La tasa de parasitismo es generalmente alta, aunque varía de acuerdo a la estación y situación.

En el laboratorio se observó que el nemátodo mudaba, se apareaba y depositaba sus huevos en arena húmeda cuando se inundaban con agua los huevos se romplan, liberando las etapas infecciosas (nemátodos preparasitos).

Uno de los principales inconvenientes que presenta éste control biológico, es el corto rango de pH al cual sobrevive (no mayor de 7.5), y una salinidad no mayor del 0.025% .

Mientras que los gusanos adultos no viven en un pH mayor de 8. (21)

6.2.5 *Dugesia dorotocephala*

Los planarios son casi todos los gusanos de vida libre, no parásitos, ampliamente distribuidos en lagos de agua dulce, estanques, pantanos, corrientes y ríos en la mayor parte del mundo.

Los planarios se reproducen sexual y asexualmente, su extraordinaria capacidad regenerativa ha sido conocida desde el comienzo de 1880. Son zoofagos; su capacidad para devorar mosquitos, entre otros pequeños invertebrados acuáticos ha sido conocida desde 1919.

El planario *Dugesia dorotocephala* sugiere ser un buen control para larvas de mosquitos y jejenes, ya que la variedad californiana de éste predador puede ser fácilmente producida en masa por fisión asexual bajo condiciones controladas, y puede ser confinado a altas densidades sin que se observe canibalismo.

Se ha demostrado experimentalmente que éste planario devasta a los mosquitos en sus sitios naturales de cría, matando muchas más larvas de las que consume.

En los lugares donde es favorable su utilización se encuentran los arrozales, zanjas camineras, lodazales de drenaje agrícola y de construcción, cuencas de retención, filtraciones de canales, efluentes de drenaje tratados, charcas de nieve fundida y de agua de lluvia.

Otra característica que lo hace conveniente es la alta resistencia que presentan los huevos y embriones ante condiciones desfavorables, lo que asegura el reciclado del depredador. (21)

6.2.6 *Lambornella clarki*.

El *L. clarki* es un pequeño protozoario ciliado parásito autónomo, perteneciente a la familia de hymenostome tetrahimenidae, que ha sido encontrado en la cavidad corporal de larvas de los mosquitos *culicine*, que se crían en agujeros de árboles.

Ocasionalmente han sido implicados mosquitos adultos, pero generalmente es la larva cuyo hemocelulo ha sido invadido y cuya muerte es entonces causada por la multiplicación del ciliado.

Estos ciliados han presentado varios grados de parasitismo facultativo, cuyos huéspedes principales son invertebrados edáficos o acuáticos, especialmente larvas dípteras.

Muchos aspectos de la relación parásito-huésped no han sido aún investigados, por lo tanto estos dos organismos, que a primera instancia parecen una alternativa, se encuentran muy por debajo del nivel de *B. sphaericus*. (21)

6.2.7 *Gambusia affinis*

Otro control biológico en el que se ha puesto mucho interés, es en el uso de peces larvivoros.

Esos peces se han utilizado para combatir los mosquitos por espacio de muchos decenios y *Gambusia affinis*, en particular se ha introducido ampliamente en muchos países. (22,50)

6.2.8 *Nothobranchius* sp.

Las especies de peces pertenecientes a este género, de los cuales el *N. guentheri* es el más conocido, son peces anuales, nativos de ciertas partes de África y que habitan cuerpos de agua temporales sujetos a periodos variables de sequía. Con excepción de *N. rachovi*, los *Nothobranchius* sp., no se encuentran donde el agua es más o menos permanente.

Los embriones, que son relativamente resistentes a la sequía y capaces de sobrevivir a largo plazo durante la estación seca,

sobreviven en la capa superior del fango. Cuando llueve nuevamente, dentro de un periodo de 6-8 meses, los embriones salen del huevo.

Los pececillos son resistentes, y éstos jóvenes crecen rápidamente en 4 o 6 semanas sexualmente maduros y desovan.

Tienen una alta fertilidad, se encuentran desovando repetidamente sobre un largo periodo. No eclosionan todos los huevos con las primeras lluvias, y la población no perece si una precipitación pluvial temprana es muy breve para que los peces alcancen la madurez sexual.

Las preferencias alimenticias son: primero, alimentos en o sobre el sedimento; segundo, alimento nectónico, y por último, cosas sobre la superficie del agua. Por ello sería más probable que una larva de mosquito fuera comida si se mueve hacia el fondo.

No se conoce hasta que punto el *Nothobranchius* resiste a la contaminación, y a que tipo resiste. Se recomienda su uso en áreas remotas. (21)

6.2.9 *Romanomermis culicivorax*

Es un nemátodo endoparásito obligatorio, cuyas larvas parásitas se desarrollan dentro de las larvas de mosquitos.

Tiene poca especificidad de género y de especie dentro de la familia de los Culicidae. Un total de 87 especies han sido expuestas a él, ya sea en el laboratorio o en el campo, resultarán infectadas.

El *R. culicivorax* ha sido muy estudiado en los últimos 10 años, se le puede producir con relativa facilidad.

Es seguro para mamíferos y otros organismos no objetivo, sus limitaciones ambientales son buenas.

Este parásito es efectivo cuando se le usa en hábitats acuáticos con las siguientes características: agua fresca dulce y no contaminada, semipermanente o permanente, cuya temperatura rara vez exceda a los 40 °C, y con poco movimiento del agua. (21)

6.2.10 *Octomermis muspratti*

Es un nemátodo mermitideo, cuyas larvas parásitas se desarrollan dentro de las larvas de mosquitos. La especie fué

colectada primeramente de larvas de mosquitos *Aedes* y *Culex*.

Está siendo investigado recientemente, debido a que es más tolerante a la desecación, salinidad y contaminación que la especie *Romanomeris culicivora*.

Hasta ahora no ha tenido éxito la producción en masa de éste nemátodo, a causa de la lenta y asincrónica eclosión de los huevos.

Los estudios de laboratorio han mostrado que las larvas de mosquitos de primer y segundo estadio son igualmente susceptibles. Su desarrollo se retarda y mueren cuando el parásito escapa através de la pared de su cuerpo.

Larvas de tercer y cuarto estadio son significativamente menos susceptibles. (21)

6.2.11 *Lagenidium giganteum*

Es un hongo parásito autónomo, que puede crecer vegetativamente, ya sea como saprófito en un ambiente acuático o como parásito en larvas de mosquitos.

Su ciclo de vida es típico del género *Lagenidium*, con reproducción tanto sexual como asexual. La zoospora del hongo es el agente infeccioso. La larva del mosquito muere cuando el hongo invade el hemocele y forma micelios extensos através del cuerpo.

Se han reportado varios aislados del hongo, y han mostrado diferencias en el rango de sus huéspedes, aunque se notó que infecta una amplia variedad de las especies de *Aedes* y *Culex*, con alguna actividad contra *Anopheles*, *Psorophora* y *Culiseta*.

La especificidad del hongo parece estar limitada a los mosquitos, y no se encontró evidencia de patogenicidad en organismos no objetivo, incluyendo a mamíferos.

L. giganteum crece *in vitro* en una variedad de medios definidos e indefinidos. Puede ser fácilmente producido en mosquitos (hasta 240,000 zoosporas/larva de mosquito) de cuarto estadio.

Este hongo tiene un gran potencial como larvicida biológico debido a su rango de huéspedes relativamente amplio, y a su capacidad para reciclarse. El inconveniente aquí es, la baja estabilidad de las esporas, pues son frágiles y solo pueden ser preservadas por unos pocos días o semanas bajo condiciones ambientales simples. (21)

6.2.12 *Entomofthora destruens*

En la naturaleza este hongo es un parásito obligado de los mosquitos adultos.

Los insectos parásitados por los hongos entomoftróceos incluyen una amplia variedad de especies y familias de los ordenes siguientes: Orthoptera, Homoptera, Hemiptera, Coleoptera, Lepidoptera, Himenoptera y Diptera.

Este hongo se presenta en un área de distribución limitada en sitios fríos y húmedos de latencia de mosquitos, durante todo el año pero es más prevaleciente en los meses de invierno.

Así, los hábitats naturales en los cuales son encontrados mosquitos infectados por el *E. destruens*, están caracterizados por la obscuridad, alta humedad (entre 60 y 96 % de humedad relativa), baja temperatura (de 1 a 14 °C) y largo contacto con los mosquitos hibernantes con las etapas infecciosas del hongo.

De esta manera, los conidios del hongo son muy susceptibles a los factores ambientales, tales como cambios de humedad, luz, temperatura y los efectos de productos químicos.

Por el contrario, las esporas inactivas son más bien resistentes.

No obstante, la limitante climatológica que presentan los conidios, es un obstáculo difícil de vencer. (21)

6.2.13 *Metarhizium anisopliae*

Es un hongo imperfecto que tiene un amplio rango de mosquitos huéspedes (más de 200 especies) en la naturaleza, y que ha sido aislado de larvas salvajes de *Culex*.

El hongo tiene un amplio rango de mosquitos huéspedes y sus conidios pueden producir altas tasas de mortalidad en larvas de *Culex* y anofelinos en dosis de 300 a 600 mg/m³.

El principal modo de acción en la mayoría de los casos, es la obstrucción del pasaje de aire através de los dos conductos traqueales de la larvas de los mosquitos.

Aunque la *M. anisopliae* es una especie cosmopolita, no se han reportado infecciones en animales de sangre caliente, y no hay reportes sobre susceptibilidad humana al hongo.

Los conidios del hongo pueden ser producidos en masa sobre un sustrato de arroz en cantidades suficientes para aplicaciones locales de campo.

Las grandes cantidades del sustrato que son necesarias para producir conidios, para tasas efectivas de aplicación de campo, requieren el desarrollo de métodos específicos de producción en masa, para hacer practico el uso de este agente fungoso.

La luz ultravioleta es perjudicial para la supervivencia de las esporas, su viabilidad se pierde más rápidamente a temperaturas bajas que a altas. (21)

6.2.14 *Coelomyces opifexi*

Es un parásito fungal obligado, de aguas salobres, reportado en larvas de mosquito. El género está ampliamente difundido y ha sido encontrado en todos los continentes excepto en la Antártida.

Desde los años 30 estos hongos han sido considerados agentes potenciales de control biológico, por su capacidad para producir epizootias en poblaciones larvales de muchas especies de mosquitos.

Su ciclo de vida es complejo con generaciones gametofitas y esporofitas que se alternan entre un huésped crustáceo intermedio (ostrácodo) y un huésped díptero definitivo.

La actividad de la meioespora y la germinación del esporangio, cesa cuando se exponen a una temperatura mayor que 30 °C. Las investigaciones muestran que los esporangios no sobreviven a este tratamiento. (21)

6.2.15 *Culicinomyces clavosporus*

Es un hongo parásito autónomo. De reproducción asexual por formación de conidios.

La infección de larvas de mosquitos se inicia con la ingestión de conidios, los cuales se adhieren a la capa quitinosa de la parte anterior o posterior del intestino.

Se ha visto que los conidios están cubiertos por una substancia mucilaginosa, la cual parece ser la responsable de la adhesión. 24 horas después de la ingestión, los conidios germinan formando cada uno un tubo que penetra al integumento e invade al hemocelo con hifa y cuerpos hifales.

Puede también ocurrir la invasión através de las papilas anales cuando la concentración de los conidios en agua es alta.

La muerte parece estar relacionada con el grado de invasión hifal y el tiempo requerido para su crecimiento.

En cuanto a la estabilidad de los conidios, solo se tienen datos de laboratorio, que indican una viabilidad del 45 % después de 6 meses a 5 °C. (21)

6.3 PRESENTE Y FUTURO DE *B. sphaericus*

La perspectiva que muestra *B. sphaericus* es muy amplia, ya que actualmente se ha mostrado un gran interés por parte de la OMS e industrias grandes, como son los laboratorios Abbot y los laboratorios Stauffer.

En México como en el resto del mundo, empieza a despertar el interés de muchos investigadores, en distintos centros.

Lograndose así, que tal vez en un futuro próximo, se logren superar los problemas y limitaciones que hasta el momento presenta. Ya que el potencial que este microorganismo ofrece, es difícilmente igualado por otros controles biológicos hasta el momento descubiertos.

Aunando a esto la imperiosa necesidad de eliminar el uso de insecticidas, por el deterioro ecológico que ya se ha causado en muchas zonas del país, así como la resistencia que han desarrollado los vectores de importantes enfermedades.

Recientemente se ha encontrado que *B. sphaericus* y *Streptomyces albus*, son capaces de degradar hidrocarburos clorinados. De ésta forma se le añade otra importante característica que es la de biodegradar insecticidas clorinados, que abre nuevas perspectivas y alternativas para darle mayor auge a éste microorganismo. (48)

7. ALTERNATIVAS PARA MEJORAR EL POTENCIAL DE *E. sphaericus*

7.1 Mejoramiento genético.

La técnica experimental conocida con los nombres de "clonación molecular", "implantación genética", "ingeniería genética molecular" o "recombinación *in vitro* de ácidos nucleicos", es actualmente la metodología más poderosa para poder resolver la estructura, organización y regulación del genoma, lo cual se analiza posteriormente con más detalle.

Brevemente enunciada; dos o más fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) son unidos (recombinados) *in vitro*, mediante el uso de una serie de enzimas.

Uno de los fragmentos, llamado vector o vehículo molecular, es capaz de replicarse en alguna célula huésped, y el otro(s) fragmento pasajero o "clonado", es pasivamente replicado por el vehículo. Como se observa en la figura 1; el DNA a clonarse, llamado en esta figura DNA heterólogo, es digerido con una endonucleasa de restricción que rompe la doble hélice de DNA en secuencias nucleotídicas específicas, generando fragmentos de DNA de diferente tamaño, pero con extremos idénticos.

El vehículo o vector molecular, que en este caso es un plásmido, es digerido con la misma endonucleasa de restricción. La enzima ligasa forma las uniones covalentes fosfodiéster entre los DNA, generando así la molécula de DNA híbrida o recombinante. Esta molécula es posteriormente introducida en la célula receptora de *E. coli*, que dará una clona con moléculas híbridas.

7.1.1 Generación de fragmentos de ADN.

Cualquier fragmento de ADN, no importando su origen, puede en principio ser clonado.

Un fragmento específico de ADN puede ser purificado antes de ser clonado o, si la clona (o colonia) portadora del fragmento puede ser reconocida o seleccionada entre un gran número de clonas que no lo lleven, el fragmento puede ser clonado sin previa purificación.

La co-clonación de una mezcla genéticamente no homogénea, de fragmentos de ADN recibe el nombre de clonación tipo "tiro de escopeta" (shotgun).

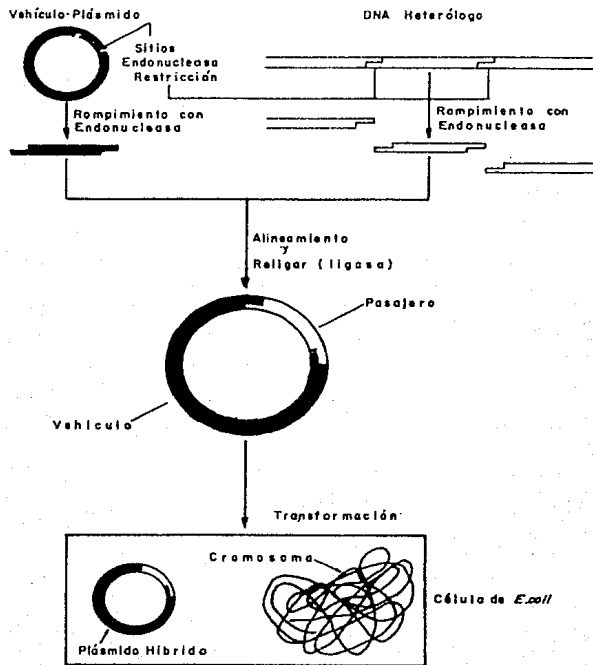


Figura 1. Clonación *in vitro*.

Existen tres alternativas para la generación de fragmentos de ADN. Uno de estos métodos es la síntesis *de novo*, y consiste en la unión de vehículos moleculares y genes sintetizados químicamente.

El rompimiento mecánico controlado es un segundo método para generar fragmentos de ADN. Este método es particularmente útil para obtener fragmentos mayores de 10,000 pares de bases (p.b.).

El tercer método para generar fragmentos de ADN, la digestión con enzimas de restricción. Es actualmente el método más usado para generar fragmentos que se desean clonar.

El sitio de reconocimiento de una enzima de restricción usualmente consiste de una secuencia específica de cuatro a seis pares de bases.

Tales sitios están más o menos azarosamente distribuidos en el ADN, ocurriendo en promedio entre cada 400 o 600 p.b. para los sitios de cuatro pares de bases y cada cuatro a seis mil p.b. para los sitios de seis.

Sin embargo, la distribución de estos sitios depende de la endonucleasa de restricción y de la composición de bases del ADN que se desea digerir.

Las nucleasas de restricción, especialmente aquellas designadas dentro del tipo II, cortan al ADN en o muy cerca de estos sitios, produciendo colecciones de fragmentos cuyos extremos son idénticos.

Estos segmentos pueden ser separados de acuerdo a su peso molecular, y una clase de fragmentos del mismo tamaño representa el material correspondiente a porciones limitadas de un genoma; esto permite al menos la purificación parcial de un fragmento antes de su clonación.

En ciertos casos cuando el tamaño de un fragmento de restricción que lleva una región genética de interés no es conocido, es posible determinarlo, utilizando un método de hibridación.

Lo anterior se observa en la figura 2, donde la línea superior representa un fragmento de ADN doble hélice que contiene una región que se desea clonar, representada por una línea negra gruesa. La línea ondulada representa un ARN transcrito que expande la región que se desea clonar. Las líneas verticales y las cruces representan sitios de rompimiento para dos diferentes endonucleasas de restricción.

A). Si la secuencia nucleotídica de la región es conocida como una molécula de ADN de doble hélice consecuentemente idéntica, puede ser sintetizada a partir de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosforados.

B). Si es posible purificar el ARN transcrito que expande la región, es factible obtener una copia de doble hélice de ADN (F). Mediante el uso de transcriptasa reversa se puede obtener la hélice sencilla complementaria y luego de remover el ARN por tratamiento con alcali, es posible obtener la doble hélice (F) mediante el uso de la misma transcriptasa reversa, o ADN polimerasa.

C) y D). El uso de endonucleasas de restricción puede permitir la obtención de fragmentos de ADN que son clonables. Si existiera un sitio de restricción para una determinada endonucleasa en el ADN a clonar, es posible obtener el fragmento mediante una digestión parcial (C). Si no existe sitio, una digestión completa genera el fragmento (D).

E). El rompimiento mecánico controlado de ADN produce una variedad de fragmentos que llevan partes de la región a clonarse, incluyendo fragmentos que llevan toda la región.

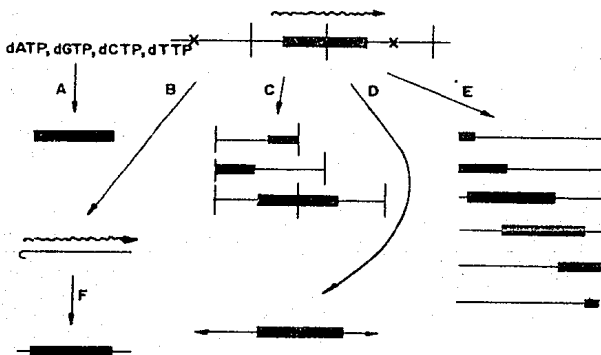


Figura 2
Métodos para generar fragmentos de ADN.

Los fragmentos de ADN son separados de acuerdo a su tamaño por electroforesis. El exámen del patrón de hibridación permite determinar que fragmento o clase en tamaños de fragmentos corresponde a la información en la molécula complementaria.

Cuando algunas enzimas de restricción rompen o cortan las dos cadenas del ADN en uniones fosfodiéster una directamente enfrente de la otra en la doble hélice, generando extremos "rasurados", sin hélice sencilla o "blunt ends", muchas de éstas endonucleasas rompen cada una de las cadenas de tal forma que las uniones fosfodiéster rotas quedan desplazadas entre sí por entre uno y cinco nucleótidos, dando lugar a la formación de fragmentos con extremos de cadena sencilla.

Hay enzimas que generan extremos de hélice sencilla con un grupo fosfato en la posición 5' y otras que generan estos extremos con un grupo hidroxilo en la posición 3', como en la figura 3, donde las endonucleasas de restricción rompen la doble hélice de ADN produciendo diferentes tipos de extremos. Las secuencias nucleotídicas reconocidas por las endonucleasas EcoRI, HaeIII y PstI están encuadradas dentro de la doble hélice. Puede observarse que estas secuencias son un palíndromo ya que se leen igual en ambas hélices siguiendo el mismo sentido.

La digestión con EcoRI produce fragmentos con extremos de hélice sencilla de cuatro bases con un grupo 5'fosfato.

La digestión con PstI produce fragmentos con extremos de hélice sencilla con extremo 3' hidroxilo.

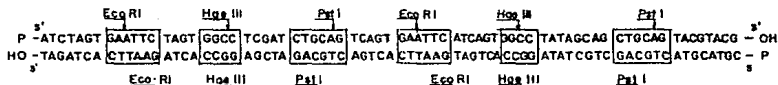
La endonucleasa HaeIII rompe la secuencia GGCC entre el par G-C generando extremos rasurados.

Estos extremos reciben el nombre de cohesivos o pegajosos y son idénticos en todos los fragmentos de ADN generados por una misma endonucleasa.

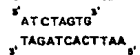
7.1.2. Unión de fragmentos de ADN.

El primer intento surgió al construir *in vitro* un genoma funcional, através de unir mitades previamente separadas del ADN del bacteriófago lambda (generadas por rompimiento mecánico), para producir genomas íntegros y unitarios de lambda capaces de infectar a *E. coli* en ensayos de transducción.

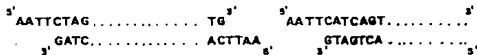
En la recombinación *in vitro* no se requieren regiones de ADN de alta homología para poder unir o recombinar dos fragmentos de ADN.



Digestión con Eco RI



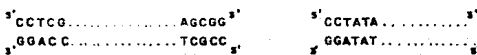
Extremos cohesivos hélice sencilla 5'



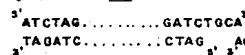
Digestión con Hae III



Extremos rasurados



Digestión con Pst I



Extremos cohesivos hélice sencilla 3'

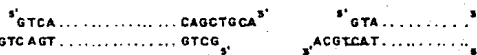


Figura 3
Rompimiento de ADN por endonucleasas de restricción.

El primer método para diseñar y desarrollar la unión de moléculas de ADN sin ninguna homología, consistió en añadir a los fragmentos de ADN "colas" (segmento de ADN no apareado) complementario de hélice sencilla usando la enzima transferasa terminal de deoxirribonucleótidos.

La transferasa terminal puede polimerizar desoxirribonucleótidos trifosfatos a partir de un extremo 3' hidroxilo produciendo una extensión o "cola" de hélice sencilla.

La estructura resultante puede convertirse en una molécula de ADN circular unida covalentemente, por tratamiento sucesivo con ADN polimerasa I, exonucleasa III y polinucleótido ligasa.

Sin embargo no es necesario llevar a cabo tratamientos enzimáticos *in vitro* ya que después de introducir la molécula de ADN en la célula por transformación, la célula es capaz de llevar a cabo las reacciones *in vivo*, como en la figura 4, donde el método de transferasa terminal para unir fragmentos de ADN de diferentes orígenes envuelve una serie de pasos, cada uno dependiente de una enzima diferente. El vehículo molecular, en este caso se ejemplifica con el plásmido ColE1 por ser el primero usado para tal efecto, es digerido con una endonucleasa de restricción, que tenga un sitio único de rompimiento en el vector. La enzima EcoRI puede usarse en ColE1, en este caso se utiliza ADN cromosomal de *E. coli* con la idea de generar un número de clones con ADN de *E. coli*, se rompe através de tratamiento mecánico o enzimático.

El método de clonación utilizando la transferasa terminal permite la unión de dos fragmentos de ADN cualesquiera, independientemente de la secuencia nucleotídica de sus extremos.

El uso de ligasa de polinucleótidos ha sido usada para unir fragmentos de ADN sintéticos a extremos de hélice sencilla complementarios, se descubrió una importante propiedad, la ligasa codificada por el bacteriófago T4 que es capaz de unir fragmentos de ADN que poseen extremos rasurados generados por síntesis química o por digestión por diferentes endonucleasas de restricción.

La unión de fragmentos de ADN utilizando la ligasa codificada por el bacteriófago T4 ofrece ciertas ventajas sobre el método de la transferasa terminal.

Cuando se unen fragmentos generados por la acción de endonucleasas de restricción, las uniones generadas a partir de extremos iguales y algunas generadas a partir de extremos no iguales, pueden subsecuentemente ser digeridas por las mismas u otras endonucleasas de restricción con las que fueron generadas.

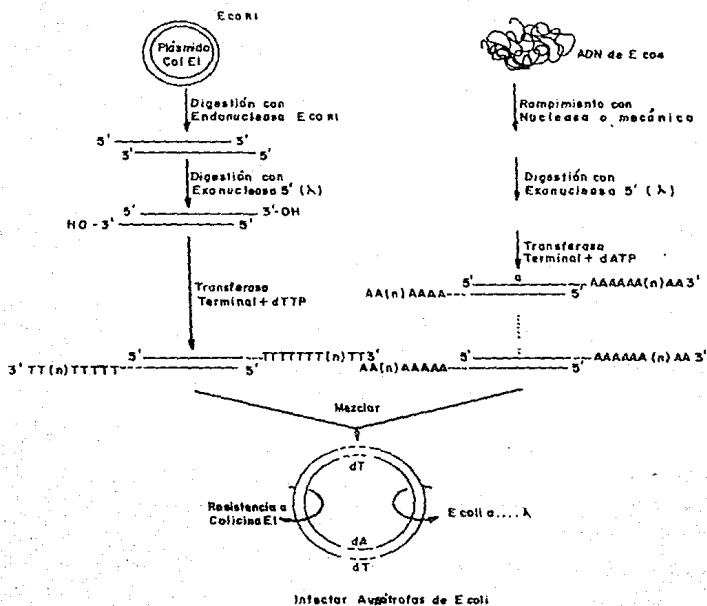


Figura 4.
 El método de transferasa terminal para unir fragmentos de ADN.

7.1.3. Transformación.

La unión de fragmentos de ADN *in vitro* no tendría significado alguno si no contara con un método que permitiera el aislamiento (clonamiento) y amplificación de un fragmento específico a partir de una mezcla heterogénea de recombinantes producidas en una reacción de ligasa.

Esto puede ser logrado si el recombinante deseado es capaz de replicarse y expresar un fenotipo dado en un organismo huésped.

La clonación molecular se lleva a cabo por medio de la introducción y estabilización (transformación) de las moléculas de ADN recombinante en las células huésped, de tal forma que una célula particular reciba cuando más una sola molécula recombinante. De esta forma es posible separar las varias moléculas híbridas de tal manera que sea permitida su reconocimiento individual através del fenotipo de clones individuales generadas por multiplicación de células transformadas.

El método para transformar un organismo huésped utilizando ADN recombinante está determinado por la identidad del organismo.

Escherichia coli es un organismo unicelular capaz de "tomar" ADN de su medio ambiente, después de haber sido tratado con cloruro de calcio aún cuando solo una subpoblación de un cultivo de *E. coli* puede volverse competente para ser transformada mediante este tipo de tratamientos.

7.1.4. Plásmidos como vehículos en *E. coli*

La mayor parte de los experimentos de clonación molecular, utilizan a *E. coli* como huésped. Los vectores utilizados en estos experimentos son plásmidos, o derivados del bacteriófago lambda que ocurren naturalmente o han sido construidos en el laboratorio.

Ambos tipos de vehículos pueden usarse para generar grandes cantidades de segmentos de ADN clonado, y en algunos casos grandes cantidades de productos genéticos.

Los plásmidos, que son ADNs circulares extracromosomales de replicación autónoma, han sido ampliamente utilizados como vectores.

Dos clases de plásmidos son los más usados en experimentos de clonación molecular. Estas clases se distinguen por sus

propiedades de replicación; una de ellas, ilustrada por el plásmido pSC101 se replica en forma restringida, y generalmente se encuentran en un número bajo de copias por célula.

La otra clase de plásmidos, representada por Col E1, llevan acabo replicación del tipo "relajada"; plásmidos de ésta clase están presentes en muchas copias por célula.

Uno de los problemas más importantes a resolver en cualquier experimento de clonación molecular, es la selección de células que llevan ADN recombinante.

Es importante tener la capacidad de seleccionar dentro de un cultivo que ha sido transformado, aquellas células en las que el vehículo transformante lleva un fragmento adicional de ADN, y especialmente aquellas células en las cuales el vector ha adquirido la combinación particular de fragmentos que el investigador desea.

Un gran número de esquemas han sido diseñados para permitir la identificación de clones en las cuales el plásmido vector contiene ADN insertado. Uno consiste en la resistencia a un antibiótico.

Otro enfoque involucra la separación del ADN a ser clonado con base a su tamaño (por ejemplo por centrifugación en gradientes de sacarosa, o electroforesis en gels de agarosa o acrilamida) antes de ser unido al vehículo.

Existe otro método que permite el análisis de ADN extracromosomal de un gran número de colonias en forma simultánea.

Una colonia, o una gota de cultivo, es lisada por tratamiento con detergente o lisozima donde éste producto es sujeto a electroforesis en gel de agarosa.

La migración de los plásmidos presentes en las colonias individuales puede ser comparada con la del vehículo utilizado en la clonación; las clones portadoras de plásmidos con ADN insertado pueden ser identificados por el tamaño más grande de sus plásmidos, que tienen una mayor migración en el gel.

Pero definitivamente el método más utilizado, se basa en la inactivación de un gene presente en el plásmido después de la inserción de ADN en ese gene.

La selección de plásmidos que llevan un fragmento o arreglo de fragmentos específicos, recae en algunos casos en la especificación de un fenotipo seleccionable codificado por el fragmento.

Una buena alternativa para mejorar el potencial tóxico de *B. sphaericus*, es el de tratar por métodos genéticos la producción de la toxina, tanto en calidad como en cantidad. (11)

7.2 ESTUDIOS DE INGENIERIA GENETICA REALIZADOS EN *B. sphaericus*

En 1983 se iniciaron los estudios con el objetivo de clonar el gen productor de la toxina.

Como es sabido, en *E. coli* se hacen los ensayos previos, por tratarse de un microorganismo muy conocido, fácil disponibilidad y tiempo corto de replicación.

Esto con las perspectivas no solo de alcanzar un gran desarrollo biotecnológico, sino también de caracterizar lo mejor posible el gen larvicida. (7,24,58)

Actualmente se ha logrado clonar en *B. subtilis* el gen que codifica la formación de la toxina, mostrando una actividad larvicida, similar a la que se alcanzó con *E. coli* en 1985, con una LC₅₀ 1-10 microgramos de células/ml., cuando la LC₅₀ de *B. sphaericus* es de 1-10 nanogramos de células/ml.

Este experimento arrojó como dato interesante que, *B. subtilis* sintetice la proteína tóxica durante el crecimiento vegetativo, a diferencia de *B. sphaericus*, que la sintetiza durante la esporulación. (23,57,58)

En caso de que en un futuro se lograran buenos resultados en cuanto a la producción de la toxina en un microorganismo, que no pueda ser usado como tal, pero que la produzca en cantidades superiores, o bien que sea más potente, que en el mismo *B. sphaericus*, donde se puede recurrir a la extracción de la toxina únicamente. Pudiéndose así usar en formulaciones más definidas.

7.3 MEZCLAS.

La realización de mezclas de microorganismos, por ejemplo, *B. sphaericus* - *B. thuringiensis*, abre toda una gama de posibilidades. Ya que si en un sistema ecológico tenemos variedades de vectores, los cuales no todos son sensibles a *B. sphaericus*, puede complementarse muy bien con *B. thuringiensis*.

También es posible, según las condiciones climatológicas, realizar mezclas con otros controles biológicos, como los que se mencionaron en el capítulo 6.

7.4 FORMULACIONES ESPECIALES.

La creación de formulaciones será el área más importante en el futuro. Ya que se necesita que en los sistemas acuáticos, donde se utilizaría como larvicida, no se vaya al fondo el microorganismo, donde es eficaz solo contra las larvas de *Aedes*, sino que permanezca en la superficie para el control de *Anopheles* y *Culex*.

Como primer intento se están desarrollando formulaciones a base de la adherencia entre esporas con hexadecano y aceite de maíz.

Donde ésta adherencia se ve favorecida en presencia de sulfato de amonio.

Los datos obtenidos sugieren que las esporas larvicidas pueden ser concentradas, para que operen en la superficie del agua, por flotación y adherencia gracias a las pequeñas gotas de aceite que se forman, logrando de ésta manera, aumentar la efectividad letal contra las larvas de los mosquitos. (49)

8. CONCLUSIONES.

Las perspectivas de desarrollo de *B. sphaericus* como bioinsecticida, a mediano plazo, son alentadoras. Las razones que fundamentan esta aseveración son:

- a) Su toxina es altamente selectiva y por tanto no se corre el riesgo de provocar algún tipo de desequilibrio ecológico.
- b) La resistencia que actualmente están presentando los vectores a los insecticidas comunmente usados, y los problemas económicos que esto acarrea, aunado a esto el peligro inminente de brotes epidemiológicos de dengue y paludismo. Así como la posibilidad de no estar exentos de las enfermedades de países vecinos (como es el caso del dengue hemorrágico de Cuba).

Es importante hacer notar la necesidad de desarrollar mecanismos bien organizados para la prevención del punto (b), evitando así las medidas correctivas, que se manejan actualmente.

La aceptación que ha tenido *B. thuringiensis* en el mercado nacional, podría extrapolarse a *B. sphaericus*, aunque su campo de acción es diferente.

El interés que ha mostrado la comunidad científica mundial y nacional al bacilo entomotóxico, se enfoca a superar las limitaciones que presentan para lanzarlo a nivel comercial lo más pronto posible, como muestra tenemos a los Laboratorios Abbot y Stauffer.

Una poderosa herramienta es la ingeniería genética, que empieza a utilizarse en *B. sphaericus*, y se espera que aproximadamente en 5 años surgan resultados alentadores, y así presenciar el lanzamiento de la cuarta generación de insecticidas.

Como ya se ha mencionado, se conoce una gran cantidad de controles biológicos, con los cuales se pueden hacer combinaciones para crear una mezcla apropiada para cada necesidad.

Por lo tanto hay posibilidades muy amplias de controlar los mosquitos en hábitats diferentes.

En la presente administración gubernamental (1988 - 1994) se ha mostrado un gran interés por el desarrollo de tecnología propia mostrándose un gran apoyo; Ya que el sector salud ha sido denominado como prioritario, al igual que el ecológico. El propio

secretario de Salud ha expresado a los medios masivos de comunicaci3n su preocupaci3n por las enfermedades transmisibles por vectores.

Esto debera ser apoyado adem3s con medidas normativas de la misma Secretaria de Salud y SEDUE con respecto a la no utilizaci3n de los insecticidas quimicos.

Asi la correcta coordinaci3n de esfuerzos pueden conducir a excelentes resultados a mediano plazo, con una tecnologia bien desarrollada, siendo lo mejor, una tecnologia propia y adecuada a nuestras necesidades.

9. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Acha, N.P. y Szyfres, B., 1966, Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales, OPS, 1016 p.
- 2.- ANIQ, 1986, Anuario Estadístico de la Industria Química Mexicana, 250 p.
- 3.- ANIQ., 1987, Guía de la Industria Química 1987-1988, 200 p.
- 4.- Ariza, L.M. y Coperias, E.M., 1988, Como fabricar animales nuevos. Muy Interesante, 5:10, 4 -10 p.
- 5.- Aslanzadeh, J. y Hendrick, H.G., 1985. Search For Mirex-degrading Soil Microorganisms, Soil Sci, 139:4, 369-374 p.
- 6.- Barjac, H., Veron, M. y Cosmao Dumanoir, V., 1980, Biochemical and serological characterization of *B.sphaericus* strains, pathogenic or non pathogenic for mosquitoes. Ann. Microbiol., 131:2, 191-201 p.
- 7.- Baumann, P., Baumann, L., Bowditch, R., y Broadwell, A., 1987, Cloning of the gene of larvicidal toxin of *B.sphaericus* 2362: evidence for a family of related sequences., Journal of Bacteriology., 169:9, 4061-4067 p.
- 8.- Baumann, P., Baumann, L., Unterman, B., Broadwell, A., et al., 1985, Purification of the larvicidal toxin of *B.sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors., Journal of Bacteriology, 163:2, 738-747 p.
- 9.- Bergey, 1975, Bergey's Manual of determinative Bacteriology, Williams & Wilkins, 1500 p.
- 10.- Biagi, F., 1976, Enfermedades Parasitarias. La Prensa Médica Mexicana, 300 p.
- 11.- Bolívar Zapata, F.G., 1979, Recombinación in vitro de ácidos nucleicos, Rev. Lat-Amér. Microbiol. 21, 37-55 p.
- 12.- Brown, H.W., 1975, Parasitología Clínica, Ed. Interamericana, 475 p.
- 13.- Bull/ Meadow, 1970, Companion to Microbiology. Selected topics for further study, Logman-London, 1300 p.
- 14.- Burges, A.D., 1981, Microbial control of pests and diseases, Academic Press, 1750 p.

- 15.- Burges, A.D., 1980, Safety Testing and Quality Control of Microbial. Academic Press, 950 p.
- 16.- Bourgouin, C., Barjac, H., 1980, Evaluation of the potential of *B. sphaericus* as an antimosquito larvicide. W.H.O. Vector Biology and Control, 23 p.
- 17.- Cerrada Bravo, et.al., 1984, La ecología del dengue y el *Aedes aegypti* investigación preliminar, Salud Pública de México, 26:5, 501-516 p.
- 18.- Cerrada Bravo, et.al., 1984, El dengue como problema de salud pública, Bol. Médico del Hosp. Médico Inf., 41:6, 301-306 p.
- 19.- Cheng, C.T., 1973, General Parasitology. Academic Press, 1350 p.
- 20.- Consultores de Negocios I.B.C.O.N., 1973, Quién tiene que sobre mercados en México, I.B.C.O.N., 135 p.
- 21.- ECO/OPS, 1984, (Serie de ecología # 10), Inf. Tec. Sobre Agentes de Control Biológico, OPS/UEM.
- 22.- Expertos de la O.M.S. en Biología de vectores y lucha antivectorial, 1986, Resistencia de vectores y reservorios de enfermedades a los plaguicidas, Serie de Informes Técnicos # 737, 97 p.
- 23.- FONEP y CECAP, 1983, Guía para la formulación y evaluación de proyectos, FONEP y CECAP, 2500 p.
- 24.- Ganesan, S. Kamdar, H. Jayaraman, K., Szulmajster, J., 1983, Cloning and Expression in *E. coli* of a DNA fragment for *B. sphaericus* coding for biocidal activity against mosquito larvae, Mol. Genet., 189, 181-183 p.
- 25.- Graham y Knight, 1965, Principle of forest entomology, Mac Graw Hill, 200 p.
- 26.- Gerhart, Murray, Costilow, Nester, et.al., 1981, Manual of methods for general bacteriology, American Soc. of Microbiol. 800 p.
- 27.- Gunther, F.A., y Jeppson, L.R. 1960, Insecticidas Modernos y la producción mundial de los alimentos, C.E.C.S.A., 155 p.
- 28.- Hertlein, B.C., Hornby, J., Levy, M., Millor, T.W. Jr., 1980, Data sheet on the biological control agent *B. sphaericus* 1593, W.H.O. 16 p.

- 29.- Hertlein, B.C., Hornby, J., Levy, R., Miller, T.W. Jr. 1980, Prospects of spore-forming bacteria for vector control with special emphasis on their local production potential, W.H.O., 11 p.
- 30.- Hertlein, B.C., Hornby, J., Levy, M., Miller, T.W. Jr. 1980, Self-life of larvicidal preparations based on the strain 1593 of *B. sphaericus*, W.H.O. 3 p.
- 31.- Hewitt, G.B., Hudleston, E.W., et. al., 1974, Rangeland Entomology, Society for Range Management, 135 p.
- 32.- Huty, S.L., Balaramas. K., 1983, Stability of virulence in *B. sphaericus*, Indian J. Med. Sci. 77, 318-325 p.
- 33.- Karch, S., Coz, J., 1983, Larval histopathology of *Culex pipiens* treated by *B. sphaericus*, Entomol. Med. Parasitol., 21:4, 225-230 p.
- 34.- Kerry, F. Harris y Maramorosch, K. 1980, Vectors of plant pathogens, Academic Press, 185 p.
- 35.- Kouri, G., et. al., 1986, Dengue hemorragico en Cuba, cronica de una epidemia, Bol. Oficina Sanit. Panam., 100:3, 322-329 p.
- 36.- Lewis, L.O., Yousten, A.A., Murray, R.G., 1987, Characterization of the surface protein layers on the mosquito pathogenic strains of *B. sphaericus*, Journal of Bacteriology, 169:1, 72-79 p.
- 37.- Massie, J., Roberts, G., White, P.J., 1985, Selective isolation of *B. sphaericus* from soil by use acetate as the only mayor source of carbon Appl Environ. Microbiol., 49:6, 1478-1481 p.
- 38.- Mizrali, A. L. Van Wezel Editores Liss R Alan Publicado por. 1984, Microbiological Factors Related to its Potential as a advances in biotechnological process, 3, 315-343 p.
- 39.- Monod, M., Mohan, S., Dubnau, D., 1987, Cloning and analysis of Ermg, a new macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance element from *B. sphaericus*, Journal of bacteriology, 169:1, 340-350 p.
- 40.- Myers, P., Yousten, A.A. y Davison, E.W. 1979, Comparative studies of the mosquito-larval toxin of *B. sphaericus* SS11 y 1593, Can. J. Microbiol., 25:11, 1227-1231 p.
- 41.- Myers, P., Yousten, A.A., 1980, Localization of a mosquito-larval toxin of *B. sphaericus* 1593, Appl. Environ. Microbiol., 36:6, 1205-1211 p.

- 42.- National Academy of Sciences, 1980, Manejo y control de plagas de insectos y animales Vol.III, Limusa, 700 p.
- 43.- Obeta, J.A., Okafor, N., 1983, Production of *B. sphaericus* 1593 Primary powder on media made from locally obtainable Nigerian agricultural products, Can. J. Microbiol., 29:6, 704-709 p.
- 44.- Ochoa Cervantes, T., 1987, septiembre 7, Patenta la UAC insecticida biologico contra plagas, La Jornada, pág 34.
- 45.- Ortiz, F., 1988, Gerente de ventas en Sandoz Agricola de México, Comunicación personal.
- 46.- Ortiz, Jimenez, M.A., 1986, Las bacterias como una alternativa en el control de insectos en México, Tesina, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M. 105 p.
- 47.- Putnam, J.L., Levi, R., Miller, T.W. Jr., 1986, Laboratory evaluations of formulations of arosurf MSF and *B. sphaericus*, J. Mosq. Control Assoc., 2:2, 233-236 p.
- 48.- Ramirez, J., 1902, Sinonimia vulgar y científica de las plantas mexicanas, Oficina tipográfica de la Sria. de Agricultura y Fomento.
- 49.- Rosenberg, M., 1986, Concentration of larvicidal *B. sphaericus* at the water surface by adherence to oil droplets, J. Microbiol. Methods, 5:2, 79-81 p.
- 50.- Sancliment Montaña, R., 1988, Jefe del depto. de normas para la detección del tratamiento en la Dirección General de Medicina Preventiva, S.S., Comunicación personal.
- 51.- Secretaria de Agricultura y Fomento, 1923, Catálogo alfabético de nombres vulgares y científicos, 157 p.
- 52.- Secretaria de Programación y Presupuesto, 1987, Microfichas del anuario estadístico, importación y exportación.
- 53.- Secretaria de Programación y Presupuesto, 1986, Anuario Estadístico, 1450 p.
- 54.- Sector Salud y Seguridad Social, 1986, Cuaderno no. 5 Información Estadística, 30 p.
- 55.- Singer, S., 1979, Use of entomogenous bacteria against insects of public health importance, Dev. Ind. Microbiol., 20, 117-122 p.
- 56.- Singer, S., 1980, *B. sphaericus* for the control of mosquitoes, Biotechnol. Bioeng., 22:7, 1335-1355 p.

- 57.- Smyth, J. 1965, Introducción a la Parasitología Animal, C.E.C.S.A., 187 p.
- 58.- Souza, E.A., Rajan, V., Jayaraman, K., 1988, Cloning and expression in *E. coli* of two DNA fragments from *B. sphaericus* encoding mosquito-larvicidal activity, *J. of Biotech.*, 7, 71-82 p.
- 59.- Tay Zabala, J., et. al., 1984, Parasitología Médica, Fco. Mendez Editor, 535 p.
- 60.- U.N.A.M. Fac. V. y Z., 1986, Zoonosis parasitarias "Memorias", 200 p.
- 61.- Velazco, Saint., 1988, Jefe del departamento de fauna nociva, Secretaría de Salud, Comunicación personal.
- 62.- Yousten, A.A., Fretz, S.B., Jelley, S.A., 1985, Selective medio for mosquito pathogenic strains of *B. sphaericus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49:6, 1532-1533 p.
- 63.- Yousten, A.A., Wallis, D.A., Singer, S., 1984, Effect of oxigen on growth, sporulation, and mosquito larvae toxin formation by *B. sphaericus* 1593, *Curr. Microbiol.*, 11:3, 175-178 p.