



Ministerio de Salud
Secretaria de Políticas, Regulación e
Institutos
A.N.M.A.T.

0143

ANEXO II

Protocolo de ensayo de campo para la evaluación de productos para el control de *Aedes aegypti*

Objetivo: Evaluar la eficacia de los insecticidas potencialmente utilizables en campañas de control del *Aedes aegypti* como adulticidas, aplicados según las técnicas convencionales de Ultra Bajo Volumen, en equipamiento pesado montado en vehículo mediante niebla fría y en equipos portátiles, tanto en termonebulización como en niebla fría.

Consideraciones generales:

1. Debido a la elevada exposición del aerosol aplicado en zonas urbanas, el producto deberá ser acompañado de un informe de factibilidad de uso, mediante parámetros toxicológicos y ambientales (Por ejemplo, irritación ocular, dérmica e inhalatoria).
2. El informe de rendimiento del producto deberá incluir cualquier causa de posible descalificación, como formación de grumos, ruptura de la emulsión, excesiva corrosión, inflamabilidad, etc.
3. La evaluación de eficacia como producto para el control de *Aedes* es requisito para campañas oficiales y no para uso profesional de control de mosquitos en forma privada.
4. Se deja establecido que las condiciones aquí redactadas son pasibles de correcciones y/o modificaciones por organismos competentes en la materia.

Capítulo 1 - Consideraciones sobre el material biológico

Los ensayos de impacto directo se realizarán sobre cepas de mosquitos susceptibles de referencia, como por ejemplo la Cepa Rockefeller. El objetivo es evaluar la eficacia de un producto, independientemente del nivel de susceptibilidad local de la población de insectos.

Las mediciones de impacto poblacional se realizaran sobre la población de campo de la zona bajo ensayo, que no deberá registrar resistencia a los productos bajo evaluación.



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación e
Institutos
A.N.M.A.T.

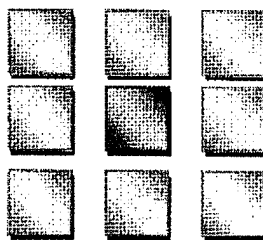
0143

Detalles sobre la cría se desarrollan en el Anexo 4

Capítulo 2 - Consideraciones sobre el área de ensayo

Las áreas tratadas y las no tratadas deben ser tan similares como sea posible con respecto al tipo de viviendas, características socio-económicas, diseño de las calles y otros factores que probablemente puedan afectar los mosquitos destinatarios y el movimiento del aerosol.

Para minimizar el efecto de mosquitos que entran de los barrios no tratados del área tratada debe incluir una zona "buffer" o de amortiguación, que se extienda idealmente 1000 m más allá del área central de evaluación entomológica. Las barreras naturales, como los ríos, espacios abiertos grandes, o bosques densos pueden sustituir la zona "buffer" o de amortiguación.



Para el ensayo de máquinas portátiles se recomienda tomar 20 casas al azar en la zona central de un bloque de nueve manzanas, de tres manzanas de lado, tratadas completamente.

Para el ensayo con equipamiento pesado, la maquinaria deberá cubrir una zona de tres hectáreas de lado, y las jaulas y/u ovitrampas ser colocadas en viviendas de la manzana central.

Se deberán considerar además otras dos zonas, una del blanco sin tratamiento, y otra del blanco positivo, contrastando contra Permetrina, en cualquiera de su enriquecimiento en isómeros, formulación CE, según metodología de uso corriente.

La metodología de aplicación será detallada en el anexo 3

Capítulo 3 - Consideraciones sobre los métodos de monitoreo

CONTROL
(X)

8



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación e
Institutos
A.N.M.A.T.

1 4 3

Se recomienda un método de medición de impacto global del rociado (impacto sobre la población local del mosquito vector) y otro de impacto directo de eficacia del producto.

10. Un monitoreo pre-tratamiento deberá ser llevado a cabo en dos áreas durante por lo menos tres días: un área tratada y otra área no tratada; ambas áreas deberán ser diariamente monitoreadas hasta que la población de mosquitos en el área rociada recupere los niveles encontrados en el pre-tratamiento. El impacto del tratamiento se evalúa comparando los cambios en el recuento diario de la población en el área tratada contra el área no tratada.

Ovitrapas
Se recomienda como método de monitoreo de la población de *Aedes aegypti* el uso de ovitrampas con infusión olfatoria atrayente, a través de la presencia de huevos (oviposición).

Detalles de esta metodología se desarrollan en el Anexo 1

Jaulas
Para la medición directa de la eficacia del producto a ensayar se recomienda la evaluación de mortalidad a 24 y 48 hs en jaulas con mosquitos adultos.

Detalles de esta metodología se desarrollan en el Anexo 2.

Capítulo 4 - Consideraciones sobre los equipos de aplicación

Se recomienda la evaluación del producto en la metodología de ULV en:

- 7 8
- a) Equipos portátiles motomochila generadores nativos de ULV en aerosol frío.

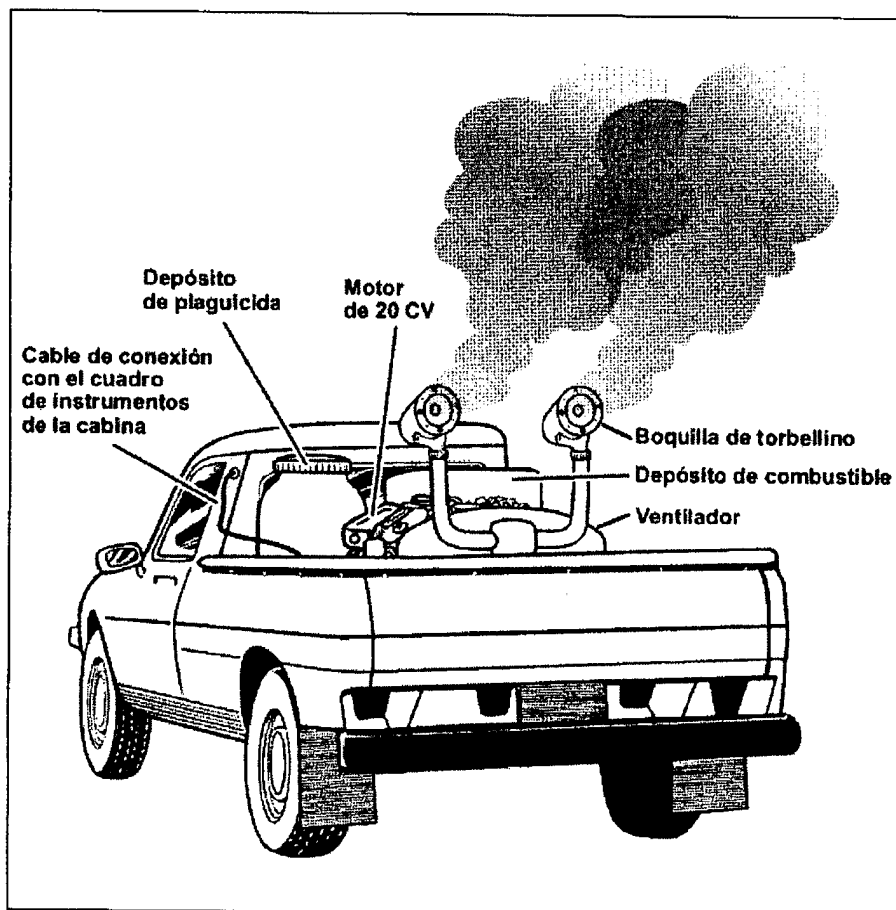
Diagrama de un inyector de combustible con sus componentes etiquetados:

- Depósito de combustible
- Carburador
- Botón de encendido
- Depósito de plágica
- Sistema de inyección de plágica
- Bomba de mano
- Protección de la cámara de combustión
- Bujía
- Cámara de combustión



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación e
Institutos
A.N.M.A.T.

0143



Calibración de los equipos

Cada insecticida tiene propiedades físicas y químicas y una efectividad biológica determinadas. Los fabricantes de insecticidas recomiendan porcentajes de dosis diferentes para situaciones de control específicas y especies concretas. Por consiguiente, se debe calibrar cada máquina para garantizar que distribuya el volumen correcto de insecticida. La tasa de aplicación de la máquina (volumen distribuido por unidad de tiempo) dependerá de la velocidad del vehículo (o el tiempo de aplicación y caudal de la boquilla por casa/vivienda con el equipo portátil), la anchura efectiva del frente de pulverización (metros) y el volumen de la preparación química según la recomendación del fabricante (litros por hectárea, incluidos los excipientes).

Las aplicaciones en base acuosa deberán contemplar el agregado de antievaporantes del tipo polietilenglicol o similar.



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación e
Institutos
A.N.M.A.T.

0143

Capítulo 5 – Consideraciones sobre la metodología de aplicación

Aplicaciones en espacios abiertos

Para calcular la tasa de aplicación del equipo montado en el vehículo, hay que conocer la velocidad del vehículo y la anchura del espacio entre los recorridos. Así, un espacio de 100 metros entre los recorridos y una velocidad del vehículo de 10 km/h, $100 \times 10.000 \text{ m/h}$, permitirá el tratamiento de $1.000.000 \text{ m}^2/\text{h}$, equivalente a 10.000 m^2 (una hectárea) por minuto. En este ejemplo, si la etiqueta del insecticida recomienda una tasa de aplicación de 0,5 litros de la formulación de volumen ultrabajo por hectárea, el caudal se debe ajustar a una distribución de 0,5 litros por minuto. El nebulizado se realizará con las boquillas apuntando hacia atrás de la trayectoria del vehículo, trayectoria que deberá ser perpendicular al viento. Las condiciones atmosféricas deberán mantenerse dentro de los parámetros ideales durante todo el ensayo

La mayoría de las máquinas de volumen ultrabajo se pueden ajustar fácilmente para lograr el caudal que se requiere.

Aplicaciones en espacios cerrados

La calibración del equipo para las aplicaciones en espacios cerrados se suele basar en la dosis por casa o habitación. Así pues, hay que calcular el tiempo necesario para pulverizar una casa o una habitación. Con un caudal de 20 ml/min y siendo la superficie de la casa de 0,04 hectáreas (400 m^2), la tasa de aplicación establecida de 0,5 litros por hectárea ($500 \times 0,04$) se distribuye en un minuto. Hay que hacer un cálculo semejante cuando se trata de otras situaciones, por ejemplo control de insectos en zonas donde hay basurales.

Detalles de ambas metodologías se describen en el anexo 3.

Capítulo 6 – Registro de datos

Los datos no tendrán ningún valor si éstos no son registrados con precisión. Cada método brinda datos basados en una rutina de 24 horas, por lo tanto diariamente debe utilizarse un nuevo formulario de registro tanto de campo como de laboratorio. Si hay datos perdidos, éstos deben registrarse cuidadosamente. Es altamente recomendable que los colectores apunten cualquier observación u otra información pertinente.

Se deberá incluir formulario de Consentimiento Informado.

Referencias seleccionadas.



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación e
Institutos
A.N.M.A.T.

0143

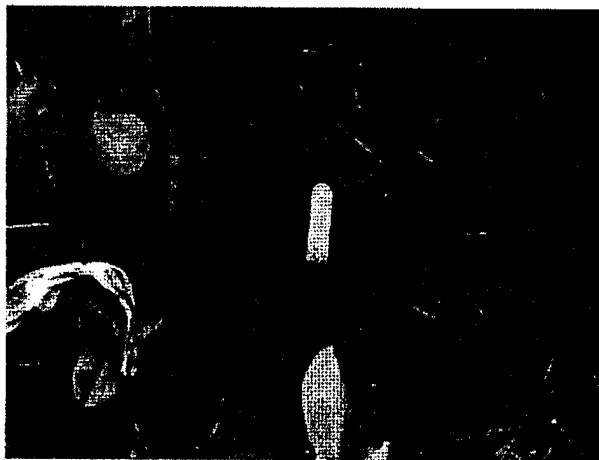
Anexo 1

Ovitrampas de infusión olfatoria atrayente

En su hábitat natural en África, el *Aedes aegypti* se cría en los agujeros de los árboles, en las axilas de las hojas y otros sitios naturales pequeños donde el agua se acumula. Sin embargo, en las zonas urbanas a lo largo de las áreas tropicales y subtropicales la especie se ha adaptado a una amplia variedad de recipientes artificiales que le sirven como sitios de oviposición. Las hembras generalmente distribuyen sus huevos entre varios sitios, simplemente pegados a la superficie sólida inmediatamente por debajo del nivel del agua. Las ovitrampas son recipientes de un tamaño conveniente que se colocan en el campo para capturar los huevos del mosquito. Pueden ser frascos de vidrio pintados de color negro, conteniendo agua limpia y una paleta de madera o de cualquier material rugoso que actúe como sustrato para la oviposición. En situaciones donde se han reducido las poblaciones del vector a niveles bajos tales que la búsqueda de larvas resulte improductiva, dicho método es un indicador útil de la presencia o ausencia de mosquitos. Sin embargo, es impropio para supervisar la actividad de oviposición diaria ya que deben dejarse en el campo durante varios días (normalmente una semana). Las infusiones de heno son mucho más atractivas a las hembras grávidas que el agua limpia; por consiguiente pueden desplegarse ovitrampas con infusión de heno en una base diaria. El promedio de huevos por trampa por día es una función del número de hembras presentes y su actividad de oviposición.

Descripción de las ovitrampas

Se recomienda usar jarras o frascos de vidrio o plástico alrededor de 500 ml, preferentemente de color oscuro. Las dimensiones no son críticas, pero todas las jarras que se usen en un estudio particular deben ser idénticas. La infusión debe hacerse empapando una cantidad fija de heno seco en una cantidad fija de agua limpia de canilla (por ejemplo 500 g en 120 l).



El *Aedes aegypti* prefiere oviponer en una superficie rugosa, por tanto la superficie interna de los frascos o las jarras se cubren con un papel rugoso absorbente que permanezca duro aun cuando está húmedo. Este papel se corta de un tamaño tal que encaje cómodamente dentro de la jarra, superponiéndolo de modo que tape toda la superficie interior de la misma para asegurar que los huevos sean puestos en el papel.

Las jarras se preparan en pares;

nosotros
hacemos
con bafalenguan



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación e
Institutos
A.N.M.A.T.

0143

una debe contener la infusión de heno y la otra una dilución al 10% de la misma infusión (una parte de infusión más nueve partes de agua). La infusión diluida usualmente recibe más huevos pero la presencia de la infusión pura agrega atracción al par de ovitrampas.

Preparación de las ovitrampas

El procedimiento de la captura debe "estandarizarse" tanto como sea posible. Algunos puntos importantes son:

- Las infusiones deben hacerse en un lugar bajo sombra.
 - Una nueva infusión debe prepararse siete días antes del día de la captura, para que el atrayente tenga siempre el mismo tiempo de preparación que en su día de uso.
 - El mismo lote de heno debe usarse para un estudio completo (la calidad de heno puede ser bastante variable).
 - La infusión debe filtrarse, a través de un cedazo o colador antes de su uso, de modo de eliminar los restos sólidos flotantes.
 - La infusión diluida debe prepararse inmediatamente antes de llenar los frascos.
 - Los frascos deben colocarse en bandejas, apilados de forma tal que se impida vuelcos o derrames durante el transporte y deben ser llenados con dos tercios de la infusión o con la dilución, usando una taza u otra medida.
 - Después de agregar la infusión, se agrega el papel para capturar los huevos, previamente etiquetado y marcado con un lápiz, el número de sitio y la fecha.
- Éste debe insertarse cómodamente para encajar con las paredes del frasco.
- Las bandejas con los frascos deben protegerse de la lluvia, la luz del sol directa y los mosquitos durante el transporte, el cual preferentemente debe ser en un vehículo cubierto.

Áreas de ensayo y sitios de muestreo

El objetivo de la captura es hacer muestreos en bastantes sitios para obtener una estimación válida estadísticamente del promedio de huevos por sitio por un período de 24 horas. Es difícil dar una cantidad específica pero la experiencia sugiere que por lo menos deben probarse 25-30 sitios. En un área de captura de 100 casas, aproximadamente en cada tercera o cuarta casa debe hacerse un muestreo. Ciertas consideraciones prácticas podrían afectar la selección de las casas en donde serán puestas las ovitrampas. Por ejemplo, los predios con portones cerrados con llave u otros obstáculos pueden impedir el trabajo de los colectores. Los sitios en donde hay niños pequeños, animales domésticos y pájaros deben evitarse porque pueden perturbar las ovitrampas.

El *Aedes aegypti* usa señales visuales para localizar sus sitios de oviposición, por lo que las ovitrampas deben colocarse en lugares en donde sean muy visibles. Es ideal en la base de una pared protegida de la lluvia y la luz directa del sol. También es preferible un fondo pálido, para contrastar con el color oscuro de los frascos. Los operadores deben explicar el propósito de su trabajo al jefe de familia y solicitar su permiso para realizar el estudio. Se les debe explicar claramente que los pares de ovitrampas se reemplazarán al mismo tiempo, todos los días, que los frascos no deben interferirse de forma alguna, y que la infusión es completamente natural e inofensiva para las personas y los animales domésticos.

Recambio del par de ovitrampas

25-30
viviendas

En un área
de 100 casas



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación e
Institutos
A.N.M.A.T.

01/03/83

HACER PLANILLA

Dos operadores con un vehículo deben poder retirar cerca de 100-150 pares de ovitrampas cada mañana. El trabajo debe restringirse al periodo de menor actividad de oviposición, típicamente dos horas después de la salida del sol y por lo menos cinco horas antes del ocaso. El nuevo par de ovitrampas debe intercambiarse por el viejo en la misma posición y en el mismo momento del día como en el día anterior. La infusión del viejo par debe desecharse y no debe reutilizarse. Los operadores deben guardar un registro de su trabajo. Si se han perturbado las trampas de forma alguna, esto debe ser anotado y el papel para huevos de ese sitio debe ser desechado. En el vehículo, deben quitarse los papeles, doblarlos por la mitad (con los huevos hacia adentro) y transferirlos a un contenedor cubierto. Los mismos pueden ser apilados pero flojamente para permitir la circulación aérea, y protegerlos de la luz del sol y el calor excesivo.

Conteo de huevos e interpretación de resultados

Los huevos son visibles a simple vista pero, para tener exactitud, es mejor contarlos en el laboratorio con la ayuda de una lupa o un microscopio binocular con una amplificación de x10. Cuando muchos huevos están presentes, un contador manual es una herramienta útil para esta tarea. También es muy útil delimitar áreas en el papel con un lápiz y contar los huevos por sección.

Si hay necesidad de eclosionar los huevos para que puedan surgir larvas para la identificación de la especie, los papeles deben guardarse húmedos durante 2-3 días, luego se cuelgan por unas líneas durante 1-2 días para secarse a temperatura ambiente. Luego dichos papeles ya pueden ser guardados en cajas o en bolsas selladas hasta el momento del conteo. Los huevos permanecerán viables durante al menos dos meses siempre que éstos sean guardados en un ambiente fresco, ligeramente húmedo y protegido de cucarachas y hormigas.

El número de huevos por papel debe anotarse en el formulario de campo. En regiones donde los huevos de otras especies de Aedes probablemente serán capturados (por ejemplo Aedes albopictus) deben criarse las muestras de larvas salidas de los huevos hasta alcanzar el tercer o cuarto estadio y examinarlas para determinar las especies presentes.

Anexo 2

Bioensayos en jaula

Los bioensayos con mosquitos en jaulas se han usado ampliamente en los trabajos de rociado espacial contra un gran rango de especies de mosquito incluso el Aedes aegypti. El sitio de ubicación de las jaulas afecta mucho la mortalidad, pero esto no es una medida del impacto global del rociado en la población del mosquito vector, por ejemplo, se observan grandes diferencias entre las proporciones de mortalidad en las

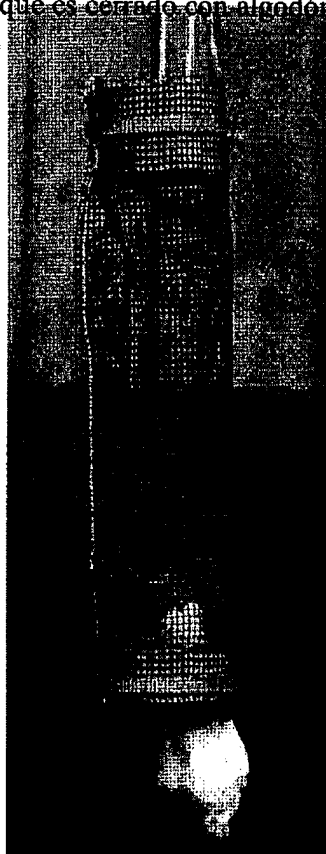


0743

Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación e
Institutos
A.N.M.A.T.

jaulas colocadas en sitios al aire libre si se compara con aquellas jaulas ubicadas en la vegetación densa, y entre las jaulas suspendidas en el centro de las habitaciones comparando con aquellas suspendidas en los armarios de ropa. Sin embargo, estas jaulas dan una indicación de la dispersión y penetración de las gotas. También son útiles para comparar la mortalidad de las cepas de *Aedes aegypti* local con cepas de referencia susceptibles.

El diseño de la jaula, los materiales y el tamaño de la malla influyen los resultados del ensayo. Las pruebas de túnel de viento indican que una pantalla cilíndrica con el eje longitudinal en posición perpendicular a la base es un diseño conveniente de jaula, sin tener en cuenta la dirección del viento. Un diseño de jaula simple puede construirse de una malla número 16 y 2 tapas de 2.5 centímetros con un largo de 2 centímetros. Los mosquitos se introducen a través de un agujero en la parte de abajo a través de un tapón que es cerrado con algodón empapado en agua.



Los mosquitos para el bioensayo deben obtenerse de huevos provenientes de la cría de cepas susceptibles. Las larvas que emergen de los huevos eclosionados deben criarse sin hacinamiento y con un suministro de comida adecuado para asegurar uniformidad en el tamaño. Poco antes del tratamiento, 20-25 hembras de



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación e
Institutos
A.N.M.A.T.

0143

24-36 horas de vida alimentadas en una solución de azúcar al 2.5%, deben transferirse a cada jaula del bioensayo. Las jaulas deben transportarse al campo en cajas protegidas del calor extremo. Por lo menos deben colocarse las jaulas en cinco casas dentro del área del tratamiento. Como un mínimo para la evaluación de rociado espacial aplicado al aire libre desde las máquinas montadas en los vehículos o desde aviones, deben localizarse las jaulas en cada casa en los siguientes sitios: (a) patio de enfrente; (b) patio trasero; (c) en el interior de un sitio expuesto y (d) dentro en un sitio protegido. El mismo número de jaulas deben exponerse en estos mismos sitios en el área no tratada. Treinta minutos después de la exposición, las jaulas deben quitarse y ser llevadas al laboratorio en sus cajas de transporte.

La mortalidad en todas las jaulas debe determinarse 24 horas después de la aplicación del rociado, a temperatura ambiente.

Anexo 3

Nebulización en espacios abiertos

Las operaciones de nebulización en la superficie de espacios abiertos deben ir precedidas de una planificación previa de la trayectoria, y en zonas con un acceso difícil o limitado de vehículos se puede necesitar una combinación de equipo montado en un vehículo y manual o de mochila. También se debe prestar atención a los aspectos siguientes:

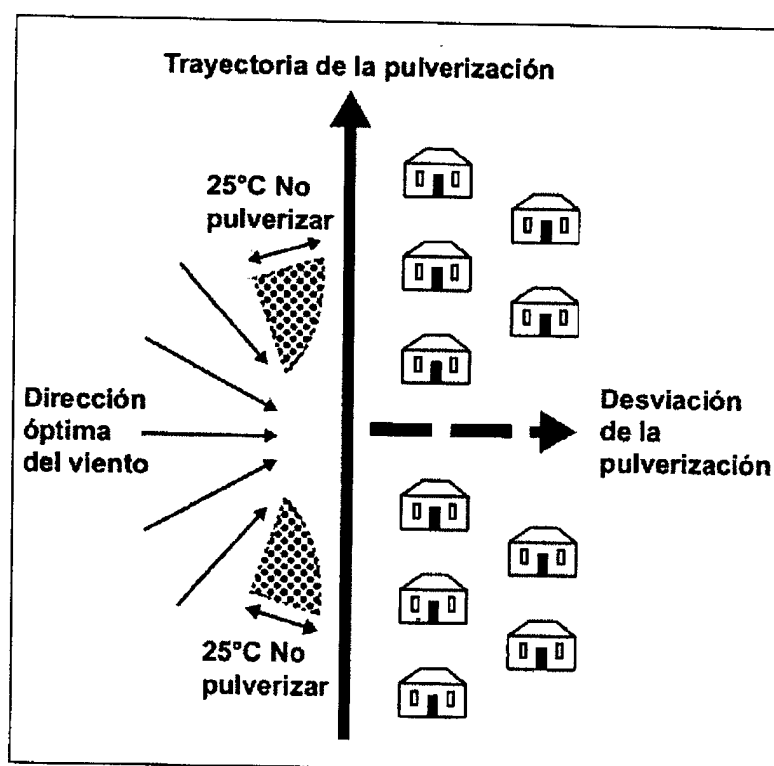
- No se debe pulverizar cuando llueve, cuando el viento alcanza una velocidad superior a 15 km/h o en las horas calurosas del día.
- Se deben abrir las puertas y ventanas de las casas y otros edificios para que entre la nube de pulverización, a fin de mejorar eficacia.
- Para el equipo montado en un vehículo el pulverizador se debe dirigir hacia la parte posterior del vehículo.
- Cuando existan barreras que impidan el flujo del aire, por ejemplo muros y vallas de separación, la boquilla de la máquina de nebulización en frío montada en un vehículo se puede orientar hacia arriba en ángulo; en los nebulizadores térmicos montados en un vehículo la boquilla se debe mantener en posición horizontal.
- La distancia entre las pasadas sucesivas a través de una zona construida dependerá fundamentalmente del trazado de las calles. Generalmente se recomienda un espacio de 100 metros entre los recorridos, moviéndose el vehículo perpendicular a la dirección del viento, de manera que la niebla se aleje del vehículo y de los operadores.



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación e
Institutos
A.N.M.A.T.

0143

- Se debe mantener, en la medida de lo posible, la velocidad previamente establecida del vehículo y desconectar el pulverizador cuando el vehículo se detiene.
- Tratar de evitar la pulverización directa de plantíos de arbustos y zonas florales costosas, a menos que se utilice un producto diluido en agua o de base acuosa.

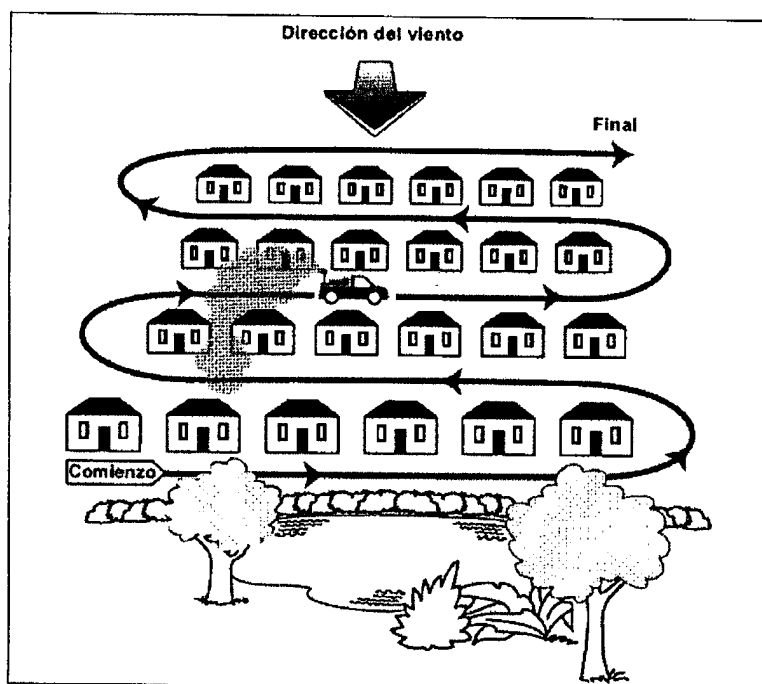


Trayectoria de la pulverización en relación con la dirección del viento en un asentamiento urbano. En este ejemplo, los primeros objetivos del frente de pulverización son los insectos adultos voladores en las proximidades del lugar de cría.



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación e
Institutos
A.N.M.A.T.

0143



Aplicaciones de ULV en interiores

El personal que realiza este trabajo requiere capacitación sobre las medidas de seguridad que se han de adoptar. Se aplican varias normas:

- Cortar toda la corriente eléctrica en el interruptor principal.
- Apagar todo el equipo de la calefacción y la cocina de cocinar, incluidas las luces piloto, y esperar a que se enfríe antes de pulverizar.
- El riesgo de incendio es menor cuando los productos están diluidos en agua.
- Proteger todos los recipientes de agua y los productos alimenticios.
- Eliminar los depósitos para peces o cubrirlos.
- Asegurarse de que todos los ocupantes y los animales estén fuera de la casa durante la pulverización y permanezcan fuera hasta 30 minutos después de su conclusión. Garantizar que se ventile el edificio antes de volver a entrar en él.
- Cerrar todas las puertas y ventanas antes de la pulverización y mantenerlas así hasta 30 minutos después de su conclusión, para garantizar una eficacia máxima.
- Los operadores encargados de la pulverización deben caminar hacia atrás, alejándose de la niebla, para reducir al mínimo la exposición.
- En edificios pequeños de un solo piso se puede pulverizar desde la puerta de entrada o por una ventana abierta sin tener que entrar en todas las habitaciones de la casa, siempre que se pueda conseguir una dispersión adecuada de las gotitas de insecticida.
- En edificios grandes de un solo piso puede ser necesario pulverizar habitación por habitación, comenzando por la parte trasera del edificio y avanzando hacia la delantera.



0143

Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación e
Institutos
A.N.M.A.T.

- En edificios de varios pisos, la pulverización se realiza desde el piso superior hacia la planta baja y desde la parte trasera del edificio hacia la delantera. Esto garantiza en todo momento la buena visibilidad del operador.

Se debe calcular el tamaño de una vivienda media (en m^2) y el volumen del producto diluido que se necesita según las recomendaciones de la etiqueta del fabricante (nota: las recomendaciones de la etiqueta de algunos fabricantes para la nebulización en espacios cerrados figuran como tasa por volumen). Hay que controlar el caudal de la máquina (ml/min) a fin de conocer el promedio del tiempo necesario para pulverizar cada vivienda e informar a los operadores encargados de la pulverización.

La niebla debe ser "seca" antes de pulverizar el interior de un edificio. Se realiza una prueba colocando la máquina en el suelo y controlando que la zona situada inmediatamente enfrente de la boquilla no se humedezca. Para reducir la producción de gotitas grandes que humedecen se ha de obtener el equilibrio correcto entre el caudal y la temperatura de combustión. Esto se suele conseguir reduciendo el caudal.

Anexo 4

Cría de *Aedes aegypti*

Se cría una cepa susceptible de *Aedes aegypti* (cepa Rockefeller o equivalente en susceptibilidad a insecticidas validada) a partir de huevos obtenidos de laboratorios de referencia que la mantengan en cría.

Para rehidratar los huevos se colocan los algodones o las paletas con aproximadamente 500 huevos en 2 lt de agua de clorada a 25 -30°C con fotoperíodo 12:12 horas. A las 24 hs se observan larvas del primer estadio. Se alimentan todas las larvas con una mezcla de alimento balanceado para conejos molido y levadura virgen de cerveza en polvo (4:1). Se mantienen en las mismas condiciones hasta la aparición de pupas. Estas son transferidas a un pequeño recipiente con agua y colocadas en una jaula hasta la aparición de adultos.

Los adultos son mantenidos en idénticas condiciones ambientales, alimentados con pasas de uva y agua en forma permanente, pero ofreciendo una paloma inmovilizada como fuente de sangre no menos de dos veces por semana para recolectar nuevamente huevos sobre un algodón humedecido.

0143