

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

GUÍA PARA LA INSTALACIÓN Y MANTENIMIENTO DEL INSECTARIO DE
***Aedes aegypti* (DIPTERA:CULICIDAE)**

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

Contenido

INTRODUCCIÓN

I. **Equipo y funcionamiento del Insectario**

- 1.1 Materiales y equipo
- 1.2 Características de las instalaciones
 - 1.2.1 Distribución de las áreas
 - 1.2.1.1 Cápsula de seguridad
 - 1.2.2 Iluminación
 - 1.2.3 Temperatura y humedad relativa
- 1.3 Reglamento y regulaciones internas.
- 1.4 Limpieza y Mantenimiento
 - 1.4.1 Normas generales del insectario.
 - 1.4.2 Especies perjudiciales para el insectario.

II. **Metodología de cría y medidas de seguridad biológica**

- 2.1 Ciclo biológico y procedimientos de manejo de colonias de *Aedes* en el insectario.
 - 2.1.1 Fase adulta
 - 2.1.1.1 Morfología
 - 2.1.1.2 Cría y manejo de la fase adulta.
 - 2.1.1.3 Alimentación sanguínea
 - 2.1.2 Huevos
 - 2.1.2.1 Bionomía y Morfología.
 - 2.1.2.2 Recolecta y manejo.
 - 2.1.3 Periodo larval o fase inmadura
 - 2.1.3.1 Alimentación durante la etapa larval
 - 2.1.3.2 Morfología.
 - 2.1.3.3 Cría y manejo del periodo larval o fase inmadura
 - 2.1.3.4 Alimentación del periodo larval y nutriente
 - 2.1.4 Período pupal

III. **Referencias**

IV. **Anexos**

- 1. Lineamientos y guía práctica para el montaje de un insectario
- 2. Guía rápida de actividades de rutina en el insectario
- 3. Guía práctica para tiras de pellón en ovitrampas

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

Introducción

La necesidad de contar con material biológico óptimo, principalmente para fines de investigación operativa aplicada a la entomología médica y para el control de vectores que nos permita optimizar los recursos y a su vez impactar de manera adecuada en las poblaciones de los insectos vectores (v. g. bioensayos de eficacia biológica, residualidad, resistencia y susceptibilidad a insecticidas), justifica la cría y mantenimiento de colonias en condiciones de laboratorio. Los insectarios que actualmente están funcionando en las Unidades de Investigación Entomológica y Bioensayos de las entidades federativas, mantienen colonias exclusivamente de insectos transmisores de enfermedades que representan un problema de salud pública. Con base en la experiencia de dichos centros, así como la adquirida por personal de salud estatal, con el mantenimiento de los insectarios y colonias endémicas de mosquitos, se conjunta el conocimiento de las técnicas empleadas, así como las condiciones de laboratorio necesarias para el desarrollo de estos, lo que justifica la recopilación de información para la estructuración de una guía o manual que las describa, y cuyo objetivo sea homogeneizar (en términos de la producción en masa y desarrollo sincronizado), la obtención constante de material biológico óptimo para el trabajo de investigación operativa como una herramienta para la toma de decisiones en el Programa de Vectores.

En esta guía se ha resumido la experiencia para presentar con practicidad, los puntos sobre la cría y reproducción de la especie *Ae aegypti*. Asimismo, se presentan recomendaciones para un mejor aprovechamiento del material biológico colectado a través de ovitrampas, considerando las necesidades e insumos usados actualmente por los programas de control integral del dengue en México.

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

I. Equipamiento y funcionamiento del insectario

1.1 Materiales y equipo

Las condiciones óptimas para el montaje del insectario con las que se debe contar son las siguientes:

• Instalación hidráulica y sanitaria.	• Papel filtro absorbente, pellón o papel estroza.
• Equipo de filtración de agua con rayos UV.	• Algodón.
• Estantes de metal con 4-5 entrepaños.	• Contador manual.
• Jaulas metálicas y/o de plástico de 30 x 30 cm y 60 x 60 cm.	• Malla mosquitera.
• Charolas de plástico blancas rectangulares (de preferencia auto claveables) de 30 x 15, 30 x 45 cm, 60 x 50 cm.	• Tul o tela tricot.
• Recipiente de plástico de 20 cm de diámetro u ovitrampas para ovipostura.	• Tubos aspiradores.
• Equipo humidificador*	• Lupas.
• Aparato para fotoperiodo automático (<i>timer</i>)**	• Marcadores.
• Termohigrómetro manual.	• Cinta masking tape.
• Termómetro digital o de mercurio.	• Contenedores de agua.
• Alimento para ratón.	• Ligas.
• Conejo, cobayo, rata o ratón.	• Pipetas Pasteur plásticas de 1, 1.5 o 3 ml.
• Calentadores de agua sumergibles con temperatura regulable***	
• Microscopio y balanza son necesarios también.	

*Recomendado para localidades con porcentajes de humedad relativa menor al 40%.

** En caso que las instalaciones no tengan fotoperiodo natural.

***Necesario en temporada invernal en zonas donde las temperaturas descienden de manera drástica.

1.2 Características de las instalaciones

1.2.1 Distribución de las áreas: el área del insectario se distribuye según las características y necesidades de la producción de mosquitos a colonizarse. Es importante resaltar las normativas nacionales e internacionales que responde a los requisitos descritos por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) –Organización Mundial de la Salud (OMS).^{1,2}

Son necesarias al menos 2 áreas: una para la cría de la etapa larvaria en charolas y otra para para la etapa adultos en jaulas de emergencia.

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”



Foto 1. Disposición de las charolas con larvas y jaulas con mosquitos.

(Unidad de Bioensayos Tabasco SSA, CERECOVE PANCHIMALCO, SSM).

1.2.1.1 Cápsula de Seguridad: Consiste en el espacio entre las dos puertas de entrada al insectario en el área de fase adulta, que mantiene el área externa y el área interna dividida; posee un ventilador extractor con la función de absorber los mosquitos que pudieran estar libres, evitando que exista riesgo de liberación, conocida como cámara de aire.



Foto 2. Cápsula de seguridad

1.2.2 Iluminación: Dado que la intensidad como el fotoperiodo afecta el ciclo de vida de los mosquitos, la iluminación debe ser permanente y estable.¹ Para *Ae. aegypti* ha funcionado adecuadamente la iluminación artificial mediante lámparas de 40, 60 y 100 watts o reflectores de 150 watts en cada área, con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad con equipo automatizado y/o natural.

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

En regiones donde el clima es predominantemente cálido, con temperaturas oscilantes de 28-30°C, se pueden establecer instalaciones con fotoperiodo natural, ubicando ventanas con vidrio translucido para permitir la entrada de luz solar, sin incidir directamente los rayos al interior.



Foto 3. Iluminado dentro del insectario

1.2.3 Temperatura y humedad relativa: las larvas de los mosquitos viven en medio acuático y pueden verse afectadas por variaciones de la temperatura ambiente¹. De manera general, se reconoce la existencia de un rango de temperatura, cuyo límite mínimo ocasiona un retraso o interrupción del desarrollo de la larva y el límite máximo, un efecto letal. En el insectario se recomienda que la temperatura del agua se mantenga entre 27-30°C¹ y la humedad relativa en un promedio de 70%, no obstante, *Ae aegypti* puede criarse hasta en un rango mínimo de entre 20-25%.

1.3 Reglamento y regulaciones internas

Para cada situación y dependiendo de los objetivos que se persigan con la instalación de un insectario, pueden establecerse reglamentos con el fin de normar y facilitar la operación en el mismo.

Puntos generales:

a. Acceso al insectario. Será limitado para el personal ajeno al mismo. El acceso deberá ser controlado por las autoridades correspondientes. Se dispone de un libro de registro y control del personal.

Es importante agregar que dentro del insectario deben observarse algunas medidas internas, tales como: el uso de bata, la introducción de alimentos solo en áreas específicas, limpieza del lugar de trabajo por responsable del área, la disposición de residuos generados y señalización de los mismos etc.

b. Regulación de la colonización de *Ae aegypti*. La cría debe de exponerse de manera visible. Su utilización se justifica de acuerdo con los temas de investigación de cada Institución. La regularización deben realizarla los autorizados por el personal correspondiente.

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

c. **Solicitud de material biológico institucional.** Todo material biológico que se solicite se debe controlar mediante un registro y oficio correspondiente. Determinar el tipo de instrucciones y los requisitos para la solicitud de material así como tiempos (solicitud de entrega).

1.4 Limpieza y mantenimiento

1.4.1 Normas generales del insectario

- ✓ Ubicación. Debe estar alejado del almacenamiento de productos químicos. No se debe poner en contacto ningún material del insectario (jaulas, bandejas y tamices entre otros) con insecticidas u otras sustancias, si bien no son precisamente químicas, pueden funcionar como repelentes.
- ✓ Las superficies de las paredes deben ser lisas, claras (blancas) y lavables.
- ✓ Debe existir al menos una toma de agua potable para el lavado de material, así como una instalación con filtro de luz UV para la purificación del agua a utilizar en la cría de larvas.
- ✓ Debe existir un solo acceso de entrada y salida al insectario, con doble puerta, creando una cámara de aire con un ventilador extractor que atraparé los mosquitos en caso de escape. (Nota: esta recomendación no debe estar por encima de cualquier norma de protección civil).
- ✓ Se debe contar con las medidas adecuadas de seguridad, tales como tapar hoyos o fisuras de la pared, así como capturar vía mecánica, con ayuda de tubos succionadores y/o aparatos colectores de mosquitos adultos que se encuentren libres en el área del insectario.
- ✓ Nunca depositar larvas o huevos en la tarja, ya que pueden sobrevivir y salir al ambiente.
- ✓ Todo instrumental que se utiliza en el insectario, se debe limpiar mecánicamente con abundante agua potable y sin detergente (en caso de aplicarse, debe enjuagarse bien y no utilizarse en el momento).
- ✓ El instrumental del insectario será de uso exclusivo del mismo.
- ✓ Para el caso de las jaulas de mosquitos y de animales utilizados en la alimentación de estos, sí debe incluirse la desinfección mecánica con soluciones de detergente y después de enjuagarse bien, aplicar secado con rayos solares, esto con el fin de utilizar la acción bactericida de los rayos ultravioletas.
- ✓ El material e instrumental para el mantenimiento de los insectos, debe evitar el contacto con fuentes de infección.
- ✓ Todo material biológico de desecho debe ser esterilizado en autoclave antes de tirarlo al contenedor de basura municipal.

1.4.2 Especies perjudiciales para el insectario. La hormiga es uno de los insectos que están presentes en cualquier área durante todas las estaciones del año y el insectario no es la excepción. Este insecto es capaz de depredar los huevos, tanto de las tiras de papel ya colectadas, así como de los recipientes dentro de las jaulas donde se lleva a cabo la ovipostura, lo mismo a los adultos que se encuentran posando en las jaulas de emergencia.

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

Las arañas identificadas en las instalaciones de cría de mosquitos se consideran inofensivas para el hombre, sin embargo, la especie *Nesticodes rufipes* aislada del interior de las jaulas de mosquitos de la especie *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*, provoca inmovilización de los adultos por medio de la telaraña que construye, lo que le permite extraer los líquidos corporales y queda sólo el exoesqueleto de éstos.³

Las cucarachas *Periplaneta americana* se consideran vectores mecánicos de agentes infecciosos y pueden ser encontradas dentro de los cuartos de cría de mosquitos.⁴

Una forma de evitar la depredación de larvas y adultos por hormigas u otros insectos es colocando un recipiente con aceite en cada una de los extremos inferiores de los estantes donde se ubican las charolas y las jaulas de mosquitos.

II. Metodología de cría y medidas de seguridad biológica

Es importante lograr un clima estable de temperatura similar a las de su hábitat natural. La mayoría de las especies (en su fase inmadura y adulto) admite parámetros de temperatura y humedad similares. Como se mencionó anteriormente, *Aedes aegypti* puede ser criado a una temperatura que fluctúa entre 27-30°C y una humedad relativa mínima de 20-25% y óptima del 70%. En áreas donde la humedad promedio es menor a 40%, se recomienda colocar equipo humidificador.

2.1 Ciclo biológico y procedimientos de manejo de colonias de *Aedes* en el insectario

2.1.1 Fase adulta

Bionomía. El mosquito adulto representa la parte final del ciclo y la fase no-acuática y reproductiva del insecto, adaptada para el vuelo y la dispersión. El mosquito adulto recién emergido pasa sus primeras 24 horas en reposo, posado sobre las superficies verticales sombreadas más cercanas al criadero, esto para permitir el endurecimiento del exoesqueleto y de las alas. En el caso de los machos, para permitir la rotación de la terminalia en 180°. Después inicia un período de vuelos cortos en busca del sexo opuesto para copular y, en el caso de las hembras, de un hospedero para alimentarse, iniciándose así la conducta de búsqueda entre las 24 y 72 horas de vida⁵. Estas dos actividades: cópula y alimentación, a menudo ocurren simultáneamente, ya que los machos son atraídos por los mismos huéspedes vertebrados a las hembras, lo cual facilita el apareamiento. Este generalmente se realiza durante el vuelo, pero en algunas ocasiones se lleva a cabo en una superficie vertical u horizontal. Al aparearse, el macho sujeta el ápice del abdomen de la hembra con su terminalia. La *bursa copulatrix* de la hembra se llena de esperma, el cual pasa a la espermateca en uno o dos minutos. Una inseminación es suficiente para fecundar todos los huevos que la hembra produzca durante su vida.

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”



Foto 4. Cópula de *Aedes albopictus*, © EID Méditerranée / J-B Ferré

Generalmente, después de cada alimentación sanguínea (2-3 µg de sangre, hasta la repleción) se desarrolla un lote de huevos. Sin embargo, *Aedes aegypti* con frecuencia se alimenta con sangre más de una vez entre cada postura, especialmente si es perturbado antes de estar completamente llena de sangre. Por consiguiente, las alimentaciones sanguíneas escasas producen menos huevos por lote y una alimentación muy reducida no los produce.

Una vez que la hembra ingiere sangre y en un periodo que comprende entre las 48 a 72 horas, está lista para oviponer.⁶ Después de la oviposición, la hembra reanuda la conducta de búsqueda de hospedero (fuente proteínica) para el siguiente grupo de huevos.⁷ La búsqueda de alimento y la puesta de huevos son eventos que definen el inicio y fin del ciclo gonotrófico o de oviposición del mosquito.

Los machos se alimentan de carbohidratos azucarados del néctar de las flores y las resinas. Las hembras en la naturaleza raramente se alimentan de azúcares.^{8,9,10} Preferentemente se alimentan de sangre humana, debido a que ésta le confiere los nutrientes necesarios para sobrevivir y reproducirse^{11,12,13,14,15,16,17} maximizando su adecuación.^{18,19,20,21,22}

Los adultos de *Aedes aegypti* pueden permanecer vivos en el laboratorio durante meses, pero en la naturaleza, generalmente viven de dos a cuatro semanas. En Kenya, se estimó que el período de vida del estado adulto rebasaba los 23 días,²³ alcanzándose una longevidad máxima de 42 días.²⁴

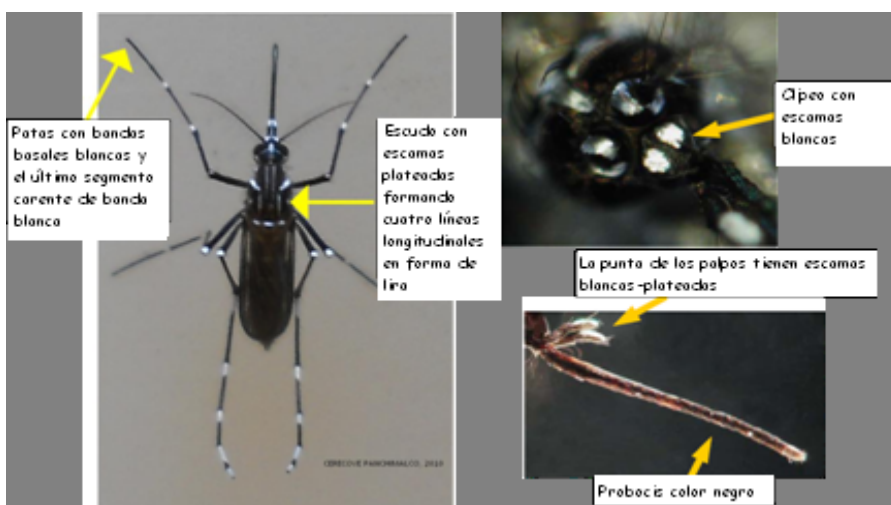
2.1.1.1 Morfología.

En su etapa adulta puede distinguirse por sus marcas torácicas características, las cuales consisten en dos grupos de escamas plateadas en forma de media luna, una a cada lado de la mitad anterior del escudo, entre las cuales

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

pasan dos líneas plateadas paralelas siguiendo la línea media del cuerpo casi hasta el escudete. Todo esto completa la ornamentación conocida como “en forma de lira invertida”. Pueden observarse también bandas blancas en los artejos tarsales y un patrón de escamas blancas a cada lado del clípeo de la hembra (Esquema 1).

Esta especie presenta dimorfismo sexual, y en la práctica, el macho puede distinguirse de la hembra por las antenas plumosas, palpos más largos y la terminalia: un apéndice en forma de ganchos.



Esquema 1.- Estructuras principales para la identificación de *Aedes aegypti*.

2.1.1.2 Cría y manejo de la fase adulta.

Para la cría de mosquitos adultos se pueden utilizar jaulas de diferentes medidas; una de las más utilizadas es la de 30.5 cm³ para una población de aproximadamente 500 ejemplares. La población de mosquitos debe ajustarse a la medida de la jaula. Por ejemplo: para una jaula de 30.5 cm³, la población total máxima debe ser de 800, con una proporción de 50% machos y 50% hembras, lo que asegura una adecuada reproducción (con un mantenimiento óptimo para la colonia) y buena producción de huevos, a fin de perpetuar la especie (Foto 5).



Foto 5. Jaulas de 30.5 cm para mantener la producción de mosquitos en el insectario. (CERECOVE PANCHIMALCO, SSM)

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

Después que emergen los adultos, y antes de alimentar a las hembras, con el objetivo de lograr cada ciclo gonadotrófico, se debe garantizar el contacto entre hembras y machos (cópula), al menos por un periodo de 48 horas, para que ocurra la fecundación. Esto se debe cumplir tanto para una población nueva como para cualquier ciclo gonadotrófico de la vida de las hembras. Por tanto de 2-3 días de edad, los mosquitos deben ser alimentados con sangre de mamífero para obtener la siguiente generación.

2.1.1.3 Alimentación sanguínea

Existen diversas técnicas para la alimentación sanguínea. En cualquiera se deberá retirar 1 a 2 horas previas el algodón con azúcar que hidrata la jaula de las hembras, de esta manera se asegura la alimentación de todas las hembras y la reducción del tiempo de exposición de la fuente sanguínea (conejo, cobayo, rata, ratón, etc.). Las técnicas son: 1) rasurar al mamífero en la región dorsal e inmovilizarlo sujetándole las extremidades. 2) Rasurar al mamífero en la zona ventral y colocarlo dentro de la jaula. A las ratas (también es posible utilizar ratas egipcias) se les rasura el pelo y se recomienda inmovilizarlas con un pedazo de tela adherido a las jaulas tipo tul o media, para meterlas completamente en la jaula. 3) En el caso de los ratones, a estos se les rasura la parte ventral y con un cartón cuadrado se le hace una perforación a la medida de la superficie rasurada del ratón para inmovilizarlo de las extremidades y fijarlo al cartón, creando una plancha que se colocará encima de la jaula con las hembras a alimentar.



Foto 6. Técnicas de alimentación sanguínea.
(CERECOVE OAXTEPEC, SSM, UIES Mazatlán)

En cualquiera de las técnicas se colocará la fuente sanguínea en el interior o sobre de la jaula durante 10 a 15 min. Para asegurar la alimentación de hembras nulíparas, se aconseja alimentar otra vez al siguiente día. Como fuente de energía y parte de la alimentación, se coloca una solución glucosada al 10 % (agua más azúcar), puesta en torundas de algodón, que deben ser cambiadas diariamente, ya que son una fuente de contaminación si se utilizan por más días, además de ser atrayente para insectos rastreros.

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

2.1.2 Huevos

2.1.2.1 Bionomía y Morfología.

Los huevos de *Ae. aegypti* son de aproximadamente 1 mm de longitud, con forma ovoide. Son de color blanco al momento de la ovipostura, pero en poco tiempo inician el proceso de endurecimiento y, horas después, adquieren un color oscuro. Los huevos son colocados por las hembras individualmente a pocos centímetros del nivel del agua de los recipientes, y cada hembra grávida de *Ae. aegypti* puede depositar sus huevos en varios recipientes, por lo que cada recipiente puede contener una mezcla de huevos de diferentes hembras.²⁴⁻²⁵

Los huevos son fecundados durante la postura y el tamaño de cada ovipostura está en función del tamaño del cuerpo del mosquito, volumen de sangre ingerida, la fuente sanguínea y la edad.²⁶ Sin embargo y de manera general, cada hembra de *Ae. aegypti* pone en promedio de 11 a 25 huevos, pero se sabe que los dos ovarios de la hembra producen hasta 100-120 huevos por ovipostura.^{27,28}



Foto 7. Fotografía de huevos viables de *Aedes aegypti*. (CERECOVE PANCHIMALCO, SSM)

El período dura varios días y habitualmente la ovipostura se lleva a cabo durante el crepúsculo, siendo más marcado este patrón durante la época de lluvias.²⁹ Las hembras son capaces de recorrer distancias de poco más de 800 m para oviponer³⁰⁻³¹, y en caso de no tener acceso a los sitios de oviposición, la hembra puede retener sus huevos por muchos días.³² El desarrollo embrionario se completa, si el ambiente es cálido y húmedo, en 48 horas pudiendo prolongarse hasta cinco días a temperaturas más bajas. Pasado este período, la eclosión puede producirse en cualquier momento dependiendo de la temperatura del agua y la concentración de oxígeno^{33,34}. Cuando los huevos son eventualmente mojados, la acción bacteriana de la materia orgánica contenida en el agua disminuye la tensión de oxígeno y proporciona un estímulo para la eclosión.³⁵

Algunos huevos hacen eclosión en los primeros 15 minutos de contacto con el agua, pero otros pueden no responder hasta que han sido mojados varias veces. No obstante, factores como la desecación, humedad constante, altas temperaturas o el manejo inadecuado, pueden tener efecto en la baja viabilidad de los huevos.³⁶

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

También es común observar que los huevos presenten diapausa cuando las condiciones son adversas (v.g. en períodos de sequías), pudiendo permanecer viables hasta 2 años.³⁷

2.1.2.2 Recolecta y manejo

Posterior a la alimentación sanguínea, las jaulas con las hembras alimentadas se mantendrán hidratadas con glucosa al 10% en torunda de algodón por 72 horas. Al término de este tiempo se colocará un recipiente con agua, el cual tendrá un sustrato que puede ser tela pellón, papel estraza o papel filtro, imitando una ovitrampa, para estimular a las hembras a la ovipostura. La cantidad de agua debe ser mínima para evitar que las hembras al oviponer se ahoguen, o bien, se pueden cortar círculos de los mismos sustratos en un recipiente húmedo, para disminuir la mortalidad de adultos por ahogamiento.

Los huevos ovipuestos en las tiras se incuban a una temperatura de 27–30 °C y a una humedad relativa de 70% (condiciones del insectario), entre 48–56 hrs. en el recipiente con agua, para favorecer la formación del embrión sin que el agua cubra los huevos, solo para mantener húmeda la tira de papel. El recipiente se dejará 72 horas, al término de este tiempo se retira el sustrato y se deja secar en hilos tipo “tendedero” en condiciones de laboratorio, protegidos de la acción de las hormigas depredadoras, se guardan en recipientes cerrados y debidamente etiquetados (nombre de la cepa, número de filial y fecha de postura). Si todo este proceso se realiza adecuadamente, se resistirá la desecación por períodos de seis meses a un año.

2.1.3. Periodo larval o fase inmadura

2.1.3.1 Bionomía.

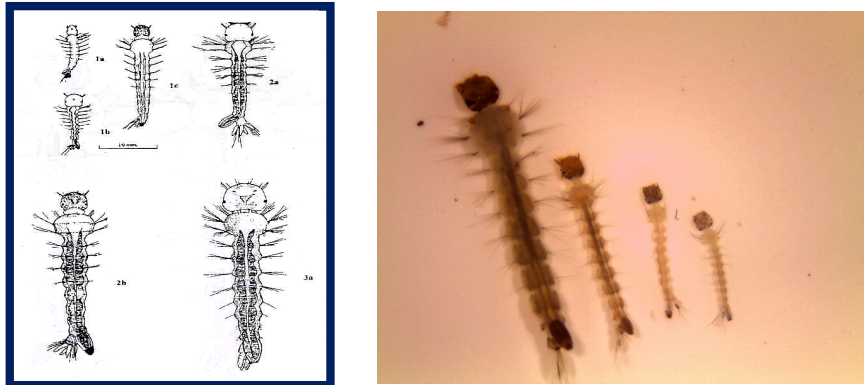
Las larvas de *Ae. aegypti* son exclusivamente acuáticas. Esta etapa constituye el período de alimentación y crecimiento de la especie. Se compone de cuatro estadios distinguibles principalmente por el tamaño, cada uno de los cuales ocurre después de la muda. Los primeros estadios en general se desarrollan rápido, mientras que el cuarto demora más tiempo, durante el cual la larva aumenta de tamaño y peso.^{38,39} En condiciones rigurosas de baja temperatura o escasez de alimento, el cuarto estadio larval puede prolongarse por varias semanas antes de transformarse en pupa. Las larvas y las pupas de los machos se desarrollan más rápidamente que las de las hembras. Por lo general, el tiempo de desarrollo de la etapa larval es de una semana⁴⁰, pudiendo prolongarse por varias semanas.^{41,42,43,44} Así, el tiempo de desarrollo puede ser variable y se presupone que depende de factores tales como la temperatura, disponibilidad de alimento, características, genéticas de la especie y el tipo de contenedor.^{45, 46}

En un ambiente estable, la mortalidad más alta de las formas inmaduras ocurre generalmente durante los dos primeros estadios larvales. Sin embargo, la mayoría de los hábitats de las larvas no son estables, son vulnerables a la desecación por el sol y la inundación por lluvia.

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

2.1.3.2 Morfología.

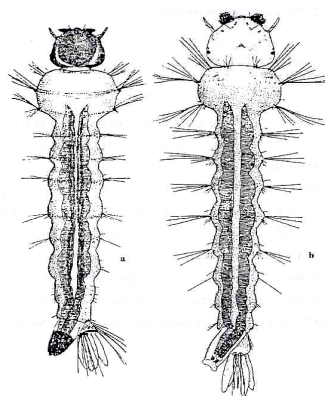
El primer estadio larval es la forma en que eclosiona el huevo. Puede identificarse principalmente por la presencia del “diente de eclosión” en la parte dorsal de la cabeza, que junto con el sifón, son característicamente blandos y transparentes (Esquema 2).



Esquema 2. Características de los tres primeros estadios larvales de *Ae. aegypti*. 1a, larva recién eclosionada; 1b, larva I en condición normal; 1c, larva apunto de mudar. 2a larva del segundo estadio inmediata; 2b larva II a punto de mudar al siguiente estadio. 3a larva inmediata del tercer estadio (modificado del Christophers, 1960).

Los estadios posteriores se identifican por su tamaño y aspecto general (esquema 2). Durante el segundo estadio, inmediatamente después de la muda y al expandirse para permitir el subsecuente desarrollo, la cápsula cefálica y el sifón se endurecen y obscurecen, y la larva se desarrolla de uno a cinco milímetros en longitud.⁴⁷

Después del segundo estadio, la cápsula cefálica y el sifón no cambian de tamaño, pero el tórax y abdomen crecen considerablemente durante cada fase. El tercero y cuarto estadio son muy parecidos. Sin embargo, una larva completamente desarrollada del tercer estadio puede distinguirse de un larva del cuarto estadio, ya que en esta última la cabeza nunca se obscurece por completo y presenta rudimentos de la trompetas ventiladoras (Esquema 3).

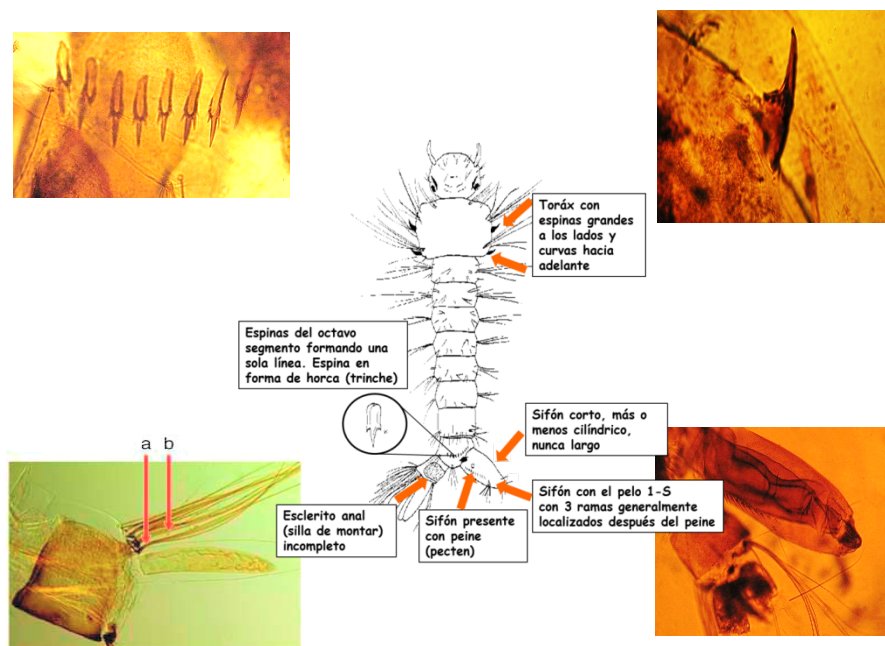


Esquema 3. Características generales del tercer y cuarto estadio larval de *Ae aegypti*. (Christophers, 1960).

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

En la larva puede distinguirse una región anterior cefálica. En ella, destacan la presencia de un par de ojos, un par de antenas y el aparato bucal-filtrador. Los ojos tienen una función visual limitada, pero son sensibles y responden a estímulos o cambios de intensidad de luz. Las antenas cumplen funciones sensoriales y perciben la dirección de las corrientes de agua así como cambios en los elementos químicos en ella. Las partes bucales presentan cerdas con las que atraen las partículas nutritivas a la boca por medio de corrientes generadas por su movimiento. Su fuente de alimentación se compone de microorganismos, particularmente bacterias, hongos y protozoarios, así como cualquier partícula de materia orgánica acumulada en las paredes y el fondo de los recipientes lo suficientemente pequeña para ser filtrada.^{48,49}

La región torácica es ovoide y sin apéndices, pero puede distinguirse la presencia de cerdas cuya función se ha sugerido puede ser táctil, para detectar la dirección de las corrientes. El abdomen consta de ocho segmentos abdominales un sifón ventilador o placa y un segmento anal con las papilas. Las principales características morfológicas específicas que se utilizan para la identificación de *Ae. aegypti* se presentan en el esquema 4.



Esquema 4. Taxonomía simplificada para identificar larvas de *Ae. aegypti*.
(FOTOGRAFÍAS: CERECOVE PANCHIMALCO, SSM)

2.1.3.3. Cría y manejo del periodo larval o fase inmadura.

En esta fase es importante que se tenga en cuenta el espacio vital, de acuerdo al tamaño de las bandejas. El cálculo del espacio vital se debe realizar en el estadio I, y debe considerarse el cuidado que hay que tener en esta etapa para la manipulación de las larvas. El ciclo larval dura de 5 a 8 días para esta especie, dependiendo de las condiciones del medio (temperatura, alimento, espacio).

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

Las larvas se alimentan en la superficie y fondo de la charola. Pasados los cuatro estadios, la larva se convierte en pupa. Al final de cada estadio, la larva muda su exoesqueleto, para permitir la continuación del crecimiento. Todas las charolas con larvas deberán estar cubiertas con malla para evitar contaminaciones ambientales de mosquitos provenientes de otras cepas que pudieran haber escapado.

2.1.3.4 Alimentación del periodo larval y nutriente

La mayoría de las dietas tiene un alto contenido de proteínas y carbohidratos, y una baja proporción de grasas; además de vitaminas del complejo B y minerales.

La alimentación larvaria es muy importante para la producción de mosquitos, esta debe ser adecuada y dependiente de la cantidad y tamaño de las larvas. Un exceso de alimento puede ocasionar mortalidad debido a la formación de una película grasosa formada sobre la superficie que impide la respiración de la larva. A su vez, una escasez de alimento ocasiona una desnutrición en las larvas y por lo tanto se lleva más tiempo para el desarrollo hasta adultos, los cuales además, serán de menor calidad.

Los alimentos se esterilizan para evitar contaminaciones con microorganismos patógenos como son hongos y bacterias.

El alimento para larvas no debe manipularse directamente con la mano para rociarlo y distribuirlo en el contenedor de larvas, ya que estaría más expuesto a la contaminación, haciéndolo menos duradero. Además, utilizando este método, la cantidad y distribución del alimento pueden no ser las adecuadas.

La larva aprovecha más el alimento cuando es pasado por un tamiz de 30 mallas y no de 100, ya que el producto de 100 es muy fino. Tomando en consideración que la larva se alimenta tanto en la superficie como en el fondo, es indispensable que el alimento se encuentre en ambas partes del contenedor de larvas. Un alimento más grueso resulta de menor posibilidad de ingesta a la larva ocasionando exceso de residuo en el fondo y a su vez ocasiona turbidez del agua y mortalidad. Por el contrario, el alimento pasado en malla de 30 es adecuado para las larvas de *Aedes*.

La densidad larval se puede calcular de acuerdo a lo recomendado por Pérez y cols., 2004, en la cual hace referencia al Instituto Pasteur (1998), el cual mide en centímetros cuadrados el área de la bandeja ($A = \text{ancho} \times \text{largo}$) y al resultado se le aplica una regla de tres, tomando en cuenta una constante para *Ae aegypti* de 500 larvas en una superficie de 625 cm² y una profundidad de 1.5 a 2 cm. Respecto a este dato, cada técnico puede bajar la densidad poblacional por charola conforme vaya observando el desarrollo de las mismas, la cual es directamente proporcional a un tiempo más corto de desarrollo entre estadios, al igual que la cantidad óptima de alimento por

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

larva. De acuerdo a la densidad larval se realizarán los cálculos para la dosificación óptima por charola. El esquema de alimentación se considera el seguido por Pérez y cols., (2004) y propuesto por Consoli y De Oliveira (1994), también usado por la CDC (de sus siglas en inglés Centers for Disease Control and Prevention) el cual provee buenos resultados de producción y un desarrollo sincronizado (Gerberg et al., 1994) (Cuadro 2).

Conforme las larvas aumentan su tamaño se puede distinguir el cambio de estadio al cual se le agregará la dosis de alimento correspondiente hasta llegar al IV estadio y se observe que las larvas empiecen a pupar. Se aconseja cambiar el agua el primer día en que empiecen a pupar, en caso que el agua este un poco turbia, esto se hará con un colador.

Período (día)	Cantidad (mg) de alimento/larva	Cantidad (mg) por charola (200 larvas)*
0 -1	0.2 (día cero es el día de eclosión)	40
2	0.3	60
3	0.4	80
4-7	0.6	120

Cuadro 2. Descripción de la dosificación de alimento por mg/larva.

**El número puede variar de acuerdo a la densidad larvaria por recipiente.*

Pasos a seguir en la preparación del alimento. El alimento que se utiliza son croquetas de ratón de laboratorio que presenta la siguiente tabla nutricional:

- Proteína cruda 23%
- Grasa cruda 4.5%
- Fibra cruda 6.0%
- Minerales agregados 2.5%
- Cenizas 2.5%

La opción a elegir se deberá ajustar a esta calidad de nutrientes y en caso de existir otros candidatos, se deberá solicitar su aprobación de uso al CENAPRECE.

El procedimiento se realiza de la siguiente manera:

1. Se trituran las croquetas en un molino eléctrico, licuadora o de manera mecánica (mortero).
2. Posteriormente se pasa por un tamiz de 30 mallas (para eliminar partículas gruesas).
3. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante un periodo entre 15 a 20 min. Se pesa la cantidad de alimento por charola en relación del estadio. Se alimentan 24 hrs y posteriormente se limpia el exceso de alimento en las charolas para una nueva alimentación, hasta llegar al periodo pupal.

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

2.1.4 Período pupal

Bionomía y morfología. La pupa, a diferencia de la larva, no se alimenta y su función es exclusivamente la metamorfosis de la larva a adulto. Tiene forma de coma cuando se observa posada en la película de agua superficial. En ella destaca la presencia de dos proyecciones originadas del tórax a manera de cuernos que son las trompetas ventiladoras por donde obtiene el aire atmosférico para la respiración. La porción terminal del cuerpo presenta unas placas anchas a manera de paletillas que le sirven para el desplazamiento. A diferencia de la mayoría de las pupas de otros insectos holometábolos, las formas pupales de los mosquitos se desplazan activamente en el medio acuático, principalmente como reacción inmediata a los estímulos externos tales como las vibraciones o cambios en intensidad lumínica. Cuando las pupas están inactivas, se mantienen en la superficie del agua debido a su flotabilidad, propiedad que facilita la emergencia del imago. Esta etapa del ciclo de vida dura, aproximadamente, de dos a tres días.⁵¹



Foto 9. Mosquito adulto emergiendo de la exuvia y en la parte inferior izquierda pupa de *Aedes aegypti*. (CERECOVE PANCHIMALCO, SSM)

Tras unos días de metamorfosis, la parte dorsal del cefalotórax se rompe y por la apertura surge el mosquito adulto.

Manejo del periodo pupal. En el insectario las pupas se retiran diariamente para el control de la edad del mosquito. Se retiran con pipetas Pasteur desechables de plástico de 1, 1.5 o 3 ml y se colocan en un recipiente que será introducido en una jaula para espera de emergencia de los adultos, lo cual se lleva a cabo 48 horas después de haber pupado. Cuando la producción es muy alta, se recomienda un succionador por vacío.



Foto 10. Charola con pupas y separación de las mismas

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

III. Referencias

1. OPS/OMS. 1983. Especificaciones generales para un insectario. Bogotá. Colombia. 2p.
2. Manual de la OMS. 1993. Laboratory biosafety manual. Invertebrates Second edition World Health Organizations. Geneva. 30-31P.
3. Sulaiman S, Powanchu Z. A, Karim M. A, Jeffery J, Busparoni V, and Wahab A .1996. Serological identification of the predators of adult *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in ribbu plantation and a cementery in Malasia. *Journal of Vector Ecology*. 21(1): 22-25.
4. Consoli Rotraut A. G. B. e De Oliveira R. L. 1994. Principales mosquitos de importancia sanitaria no Brasil. 228 p. Editora Fiocruz.
5. Reyes-Villanueva F. 1990. El dengue. Bionomía del vector, transmisión y opciones para su control en México. *Ciencia* 41: 45-55.
6. Carrada B. T., Vázquez V. L. e I. L. García. 1984. La ecología del dengue y el *Aedes aegypti*. Investigación Preliminar. Tercera parte. *Salud Pública* 26(3): 297-311.
7. Klowden M. J. 1990. The endogenous regulation of mosquito reproductive behavior. *Experientia* 46: 660-670.
8. Edman, J.D.; Strickman, P.; Kittayapong, P.; Scott, T. W. 1992. Female *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) in Thailand rarely feed on sugar. *Journal of Medical Entomology*. 29:1035-1038.
9. Van Handel, E.; Edman, J. D.; Day, J. F.; Scott, T. W.; Clark, G. G.; Reiter, P.; Lynn, H. C. 1994. Plant-sugar, glycogen and lipid assay of *Aedes aegypti* collected en urban Puerto Rico and rural Florida. *Journal of the American Mosquito Control Association*.10: 149-153.
10. Costero, A.; Attardo, G. M.; Scott, T. W.; Edman, J. D. 1998. An experimental study on the detection of fructosa in *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*.14: 234-242.
11. Chow, E.; Wirtz, R. A.; Scott, T. W. 1993. Identification of Blood meals in *Aedes aegypti* by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 9: 196-205.
12. Scott, T. W.; Chow, E.; Strickman, P.; Kittayapong, P.; Wirtz, R. A.; Lorenz, L. H; Edman, J. D. 1993. Blood feeding patterns of collected in a rural Thai village. *Journal of Medical Entomology*. 30: 922-927.
13. Scott, T. W.; Clark, G. G.; Lorenz, L. H.; Amerasinghe, P. H.; Reiter, P.; Edman, J. D. 1993a. detection of multiple blood feeding in *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histologic technique. *Journal of Medical Entomology*. 30: 94-99.
14. Scott, T. W.; Morrison, A. C.; Lorenz, L. H.,; Clark, G. G.; Strickman, P.; Kittayapong, P.; Zhou, H.; Edman, J. D. 2000. Logitudinal studies of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: Population dynamics. *Journal of Medical Entomology*. 37: 77-88.
15. Scott, T.W.; Amerasinghe, P. H.; Morrison, A. C.; Lorenz, L. H.; Clark, G. G.; Strickman, P.; Kittayapong, P.; Edman, J. D. 2000. Logitudinal studies of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: Blood feeding frequency. *Journal of Medical Entomology*. 37: 89-101.

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

16. Scott, T. W.; Naksathit, A.; Day, J. F.; Kittayapong, P.; Edman, J. D. 1997. A fitness advantage for *Aedes Aegypti* and the viruses it transmits when female fed only human blood. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 57: 235-239.
17. Costero, A.; Edman, J. D.; Clark, G. G.; Scott, T. W. 1998. Life table study of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) in Puerto Rico fed only human versus blood plus sugar. *Journal of Medical Entomology*. 35: 809-813.
18. Naksathit, A. T.; Scott, T. W. 1998. Effect on female size on fecundity and survivorship of female *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) fed only human blood versus human blood plus sugar. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 14: 148-152.
19. Harrington, L. C.; Edman, J. D.; Scott, T. W. 2001 Why do female *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood?. *Journal of Medical Entomology*. 38(3): 411-422.
20. Morrison, A. C.; Costero, A.; Edman, J. D.; Clark, G. G.; Scott, T. W. 1999. Increase fecundity of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) fed human blood prior to release in a mark-recapture study in Puerto Rico. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 15: 98-104.
21. McDonald, P. T. 1997. Population characteristics of domestic *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) in villages on the Kenyan Coast. I Adult survivorship and population size. *Journal of Medical Entomology*. 14: 42-48.
22. Trips, M.; Hausermann, W. 1986. Dispersal and other population parameters of *Aedes aegypti* in a African village and their possible significance in epidemiology of vector-borne diseases. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 35: 1263-1279.
23. Apóstol, B. L.; Black, W. C.; Reiter, P.; Miller, B.R. 1994. Use of randomly amplified polymorphic DNA amplified by polymerase chain reaction to estimate the number of *Aedes aegypti* families at oviposition sites in San Juan, Puerto Rico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 51: 89-97.
24. Reiter, P.; Gubler, D.J. 1999. Surveillance and control of urban dengue vectors. En Gubler, D.J. y Kuno, G. (eds.). *Dengue and Dengue Hemorrhagic*. CAB international. Wallingford, U.K. P425-462. C20.
25. Apóstol, B. L.; Black, W. C.; Miller, B.R; Reiter, P.; Beatty, B. J. 1993. Estimation of the number of full sibling families at an oviposition site using RAPD-PCR markers application to the mosquito *Aedes aegypti*. *Theoretical and Applied Genetics*. 86: 991-1000.
26. Chadee D. D. y P. S. Corbet. 1987. Seasonal incidence and diel patterns of oviposition in the field of the mosquito, *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in Trinidad, West Indies: a preliminary study. *Ann. Trop. Medicine and Parasitol*. 81(2): 151-161.
27. Reiter P., Amador M. A., Anderson R. A. y G. G. Clark. 1995. Dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood-feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 52:177-179.
28. Reiter P. 1996. Oviposition et dispersion d' *Aedes aegypti* dans l' environnement urbain. *Bull. Soc. Path. Ex*. 89: 120-122.

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

29. Honório N. A., da Costa Silva W., Leite P. J., Goncalves J. M., Lounibos L. P. y R. L. de Oliveira. 2003. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98(2): 191-198.
30. Shannon y Putnam. 1934. The biology of *Stegomyia* under laboratory conditions. I the analysis of factors wich influence larval development. *Proc. Ent. Soc. Wash.* 36:185-216.
31. Christophers, K. M. 1960. *Aedes aegypti* L. The yellow fever mosquito. Cambridge University Press. GB. 784 pps.
32. Hien, Do. Si. 1975. Biology of *Aedes aegypti* (L., 1762) and *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera: Cilicidae). II Efect of environmental conditions on the hatching of larvae. *Acta Parasitologica Polonica.* 23(45): 537-552.
33. Edgerly J. S., McFarland M., Morgan P. y T. Livdahl. 1998. A seasonal shift in egg-laying behaviour in response to cues of future competition in a treehole mosquito. *J. Animal Ecol.* 67:805-818.
34. Bar-Zeev, M. 1958. Effect of the temperature on the growth rate and survival of the immature stages of *Aedes aegypti* (L.). *Bulletin Entomological Research.* 49: 157-163.
35. Rueda, L.; Patel, K. J.; Axtell, R. C.; Stinner, R. E. 1990. Temperature-dependent development and survival rates of *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). *Journal of Medical Entomologyl.* 27(5): 892-898.
36. Manrique-Saide, P.; Ibáñez-Bernal, s.; Delfín-González, H.; Parra, V. T. 1998. *Mesocyclops longisutus* effects on survivorship of *Aedes aegypti* immature stages in car tyres. *Medical Veterinary and Entomology.* 12:386-390.
37. Wada. 1965. Effect of larval density on the development of *Aedes aegypti* (L.) and the size of adults. *Quaestiones Entomologicae.* 1:223-249.
38. Tun-Lin, W.; Burkot, T. R.; Kay, B.H. 2000. Effect of temperature and larval diet on development rates and survival of the dengue vector *Aedes aegypti* in north Queensland, Australia. *Medical Veterinary and Entomology.* 14: 31-37.
39. Crovello, T. J.; Hacker, C. S. 1972. Evolutionary strategies in life table characteristics among feral and urban strains of *Aedes aegypti* (L.). *Evolution.* 26:185-196.
40. Focks, D. A.; Sackett, S. R.; Bailey, D. L. y Dame, D. A. 1981. Observation on container breeding mosquitoes in New Orleans, Louisiana, with an estimation of the population density of *Aedes aegypti* (L.). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 30: 1329-1335.
41. Fouque, F.; Carinci, R. 1996. *Aedes aegypti* in French Guiana: some aspects of history, general ecology and vertical transmission of dengue virus. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique.* 89(2): 115-119.
42. Burgess, N. R. H.; Cowan, G. O. 1993. *A colour Atlas of Medical Entomology.* Chapman y Hall. G. B.
43. Bates, A.W. 1949. *The Natural History of Mosquitoes.* Peter Smith. E.U.A.
44. Merrit, R. W.; Dadd, R.H.; Walker, E. D. 1992. Feeding behavior, natural food and nutritional relationship of larval mosquitoes. *Annual Review of Entomology.* 37:349-376.

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

45. Nelson, M.J. 1986. *Aedes aegypti*: biología y ecología. Organización Panamericana de la Salud. E. U.A.(Alfredo)
46. Focks DA, Haile DG, Daniels E, Mount GA.1993. Dynamic life table model for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): analysis of the literature and model (Alfredo)development. J Med Entomol. Nov; 30(6):1003-17.
47. Pérez O., Rodríguez J., Bisset J. A., Leyva M., Díaz M., Fuentes O., Ramos F., González R y García I. 2004. Manual de indicaciones técnicas para insectarios. Editorial Ciencias Médicas. Habana, Cuba. 59 pp.
48. Gerberg E. J., Barnard D. R. y Ward R. A. 1994. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. AMCA Bulletin No. 5. Allen Press. Kansas, E. U. 98 pp.
49. Couret J, Dotson E, Benedict MQ (2014) Temperature, Larval Diet, and Density Effects on Development Rate and Survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). PLoS ONE 9(2): e87468. doi:10.1371/journal.pone.0087468

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

IV. Anexos

1. Lineamientos y guía práctica para el montaje de un insectario.

Medidas de seguridad

1. Contar con las medidas adecuadas de seguridad como colocar puertas con malla mosquitera, tapar los hoyos o fisuras de la pared, solo debe existir un acceso de entrada y salida al insectario, con doble puerta, creando una cámara de aire con un ventilador extractor que atraparán los mosquitos en caso de escape.
2. La tarja debe contar con un sistema de malla fina, y nunca depositar larvas o huevos por esta vía, ya que pueden sobrevivir y salir al ambiente.
3. Todo material biológico de desecho debe ser autoclavado antes de descartarlo a la basura.
4. En ciertas regiones del país las hormigas son un problema serio ya que depredan huevos, larvas, pupas y adultos. Para evitarlo se colocan en la base de los estantes recipientes con aceite y de esta forma no podrán subir las hormigas.
5. Los mosquitos que se encuentren fuera de alguna jaula en el área de insectario, deben ser recolectados con aspiradores manuales o automáticos para su eliminación.

Condiciones ambientales del insectario

6. Respetar el fotoperiodo de 12:12 luz-obscuridad. La temperatura del insectario debe ser de $27 \pm 3^{\circ}\text{C}$. A esta temperatura pueden mantenerse las larvas y adultos en el mismo cuarto.
7. Contar con un sistema de agua limpia, que no tenga contacto con algunos productos químicos como cloro o temefos.

Incubación de huevos

8. Los huevos embrionados se introducen junto con las tiras de papel filtro o pellón dentro de charolas con agua y se dejan a temperatura ambiente. Las larvas eclosionarán de 5 a 24 hrs.

Condiciones especiales

9. Si se requieren larvas con desarrollo uniforme, se puede colocar la charola con huevos en una incubadora por 5 hrs (o hasta que eclosionen) a 30°C . Se requiere de estar vigilando la eclosión de los huevos.
10. Otro método de incubación, en caso de no contar con incubadora, es colocar al sol el recipiente con huevos, pero debidamente protegidos por un tul y ligas para evitar contaminaciones con insectos locales.
11. Para la obtención de larvas en ciudades donde las temporadas invernales se presentan de forma severa, se recomienda la utilización de calentadores sumergibles con temperaturas regulables (de acuarios) de 20 litros de capacidad.

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

Manejo de larvas

12. El cuarto de larvas debe estar perfectamente iluminado, se recomienda colocar luz en la pared lateral o en la parte superior.
13. Para las charolas de 30X30X5 cm se recomienda una densidad larvaria de 500 larvas, para las charolas de 24.5x19.5x2cm se recomienda una densidad larvaria de 240⁵². A esta charola se le agrega un litro de agua limpia, resultando en una lámina de agua de 1.5 cm. De preferencia las charolas deben tener colores claros (blancas) y de ser posible de material durable.
14. El lavado de las charolas debe ser riguroso y con jabón biológico, y enjuagar con abundante agua para evitar mortalidad por residuos de jabón.
15. Las larvas se alimentan diariamente (puede prescindirse el alimento al segundo día) con alimento preparado tal y como se describe en el manual. La frecuencia y cantidad de alimento es de 0.4 gr para 1º y 2º estadio y 0.8 gr para 3º y 4º estadio.

Colecta de pupas

16. Una vez completo el desarrollo larvario los mosquitos entran en una fase de pupa, previa a la etapa adulta. Las pupas se colectan diariamente utilizando un gotero o bomba de succión y se colocan en otro recipiente de plástico, que dependerá el tamaño de acuerdo al número de pupas colectadas. No se recomienda conglomerar muchas pupas, dado que puede ocasionar mortalidad a las mismas. Estas pupas se pueden introducir directamente a una jaula o se puede cubrir el recipiente con tul y ligas para evitar la liberación de los adultos. Si se requiere “diferenciar el sexo de las pupas”, las de tamaño más grande son las hembras y las más pequeñas los machos, con una certeza del 95%.
17. Se recomienda que en todo el proceso, desde el huevo hasta la pupa, se mantenga una temperatura constante de agua, ya que cambios bruscos en ésta puede causar mortalidad.

Manejo de adultos

18. Los adultos se introducen en jaulas metálicas de 30 cm³ o 45 cm³, con densidad de 500 y 1,500 mosquitos, respectivamente.
19. Se coloca algodón con agua azucarada sobre la jaula de adultos, cada tercer día para mantener vivos a machos y hembras.

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

Reproducción de adultos

20. Los machos y hembras pueden copular en espacios pequeños (hasta 30 cm³), para ello se introducen los mosquitos en jaulas y se mantienen ahí por tres días, buscando favorecer el apareo e inseminación de las hembras.
21. Al cuarto día se pueden alimentar con fuente sanguínea (mamífero pequeño), con diversas técnicas, tal y como se menciona en la sección 2.1.1.1. Para agilizar el proceso de alimentación, a las hembras de mosquitos se les retira el algodón de 1 a 2 horas previas y así se acorta el tiempo de exposición del mamífero pequeño a los mosquitos.
22. Después de la alimentación sanguínea, es necesario esperar 72 hrs para colocar uno o varios recipientes de oviposición, que pueden ser de tamaño variable; el único requisito es colocar agua limpia y papel filtro, estroza o pellón en la parte interior, simulando una ovitrampa.
23. Los huevos se sacaran de la jaula a las 72 hrs siguientes para asegurar la embriogénesis *in situ*.

Método para embrionar los huevos

24. Las hembras en campo oviponen normalmente al atardecer, una o dos horas antes de ocultarse el sol. Los huevos de las ovitrampas o de los trastes de oviposición, deberán mantenerse de 48 a 72 hrs, a temperatura controlada dentro del insectario y en contacto con una superficie húmeda para que el embrión (larvita) se desarrolle adecuadamente, por lo que se recomienda se deje en el recipiente de ovipostura dentro de la jaula.
25. Una vez completo el período de embriogénesis, se colocan las tiras con los huevos en una charola limpia y seca, o se cuelgan con un hilo tipo “tendedero” para el proceso de secado dentro del insectario. Este proceso es gradual, así que las tiras se secan lentamente, manteniéndolas por dos días y después, se pueden almacenar en bolsa de papel estroza, correctamente etiquetados (fecha de término del proceso, generación de la colonia, cepa y número de huevos) permaneciendo en estado de diapausa hasta por un año.

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

Anexo 2. Guía rápida de actividades de rutina en el insectario

Actividad	Recomendación
Verificar el volumen de agua de las charolas	<ul style="list-style-type: none"> El agua deberá tener una profundidad de 1.5 a 2 cm o más dependiendo de las charolas de eclosión. Cambiar en caso de estar muy sucia por exceso de alimento con ayuda de un cedal o tela tricot.
Alimentación de larvas	<ul style="list-style-type: none"> Tomar en el estadio de las larvas y la densidad por charola.
Siembra o distribución de larvas recién eclosionadas, si las hay	<ul style="list-style-type: none"> Dependiendo el área de las charolas se calculará la densidad multiplicando largo (cm) x ancho (cm), tomando como constante que 500 larvas de <i>Aedes aep.</i> son a 625 cm²,
Sacar pupas de charolas	<ul style="list-style-type: none"> Colocar en recipientes cubiertos con tul o introducir en jaulas. Etiquetar: origen, fecha.
Alimentación de mosquitos hembras con conejo fuente sanguínea (mamífero pequeño)	<ul style="list-style-type: none"> Hembras de al menos 3 días de edad (asegura cópula), retirar algodones 1 a 2 hrs antes.
Cambio de algodones a jaulas con adultos (azúcar al 10%)	<ul style="list-style-type: none"> Diariamente, para evitar contaminación con hongos o bacterias y deshidratación.
Colocación de sustrato para ovipostura	<ul style="list-style-type: none"> Sumergir la tira de pellón, estroza o filtro en un recipiente con agua, observando que esté hidratado las 72 hrs que se dejará dentro de la jaula de las hembras con 3 días post-alimentación.
Retiro de sustrato, secado y almacenamiento	<ul style="list-style-type: none"> Se retira el pellón y se cuelga por 24 hrs para secar a temperatura dentro del insectario, posterior son guardados en recipientes debidamente etiquetados (fecha de término del proceso, generación de la colonia, cepa y número de huevos)
Lavado de material generados	<ul style="list-style-type: none"> Jabón neutro, enjuagar con abundante agua

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

Anexo 3. Guía práctica para tiras de pellón en ovitrampas.

Actividad	Recomendación
Sumergir la tira de pellón	<ul style="list-style-type: none"> • La capacidad de absorción de agua del pellón es proporcional a la parte sumergida. • El agua se evapora de 0.6 a 1 cm por día en la ovitrampa. Tomando en cuenta que al 7º día se retiran.
Retirar las tiras de las ovitrampas	<ul style="list-style-type: none"> • Las tiras no deben de permanecer por más de 4 horas sin humedad, razón por la cual el técnico operativo llevará su cámara húmeda al trabajar su área.
Conteo de huevos	<ul style="list-style-type: none"> • El técnico operativo contará uno a uno los huevos colocados en el pellón, con ayuda de una lupa 10x, y valiéndose de técnicas de conteo de huevos cuando estos son mayores a 100, registrando en ese momento el número total por ovitrampa.
Lavado de la ovitrampa	<ul style="list-style-type: none"> • Al término del conteo de huevos o antes según se acople el técnico, la ovitrampa será lavada y tallada con agua de uso, para evitar que se queden huevos en las paredes.
Llenado de la ovitrampa	<ul style="list-style-type: none"> • La ovitrampa se llenará con agua de la llave, evitando el uso de agua con temefos (del tanque o tambo), si es una región donde no hay agua entubada, se tendrá que llevar sus botellas de agua para ovitrampas.
Secar las tiras de pellón	<ul style="list-style-type: none"> • Al llegar al laboratorio, insectario o sede, se colgarán las tiras a la sombra en un hilo tipo “tendedero” para el secado a temperatura ambiente, nunca exponer directamente al sol.
Guardar para conservar y/o envío	<ul style="list-style-type: none"> • Doblar las tiras secas por la parte interna (donde se encuentran los huevos) y colocarlas en bolsas de papel estraza, debidamente etiquetadas para su conservación y/o envío, fuera del alcance de hormigas.