

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA -LEON**  
**(UNAN-LEÓN)**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE AGROECOLOGÍA**



**PRODUCCIÓN DE VIRUS DE LA POLIEDROSIS NUCLEAR EN EL  
LABORATORIO DE CONTROL BIOLÓGICO: Elementos para el control de  
Calidad. CIRCB, UNAN-LEON.**

**Presentada por:**

**Br. Flor de María Rodríguez Laínez.**

**Trabajo presentado como requisito para optar al título de Ingeniería en  
Agroecología Tropical**

**Tutora: MSc. Carmen Marina Rizo Z.**

**León, 22 de noviembre del 2006**

## INDICE GENERAL

Índice General.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Resumen.....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
III. HIPÓTESIS.....	4
IV. MARCO TEORICO.....	5
4.1 Aspectos Generales.....	5
4.1.1 Morfología.....	5
4.1.2 Modo de Acción y sintomatología.....	6
4.2. Ecología de los virus.....	7
4.3 Métodos de producción de Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN).....	7
4.3.1 Producción In Vitro.....	7
4.3.2 Producción In Vivo .....	9
4.3.2.1 Producción en campo.....	9
4.3.2.2 Producción en laboratorio.....	9
4.4. Factores a considerar para maximizar la producción de virus.....	12
4.5 Control de Calidad.....	13
4.5.1. Control de la producción.....	14
4.5.2. Control del proceso .....	14
4.5.3. Control del producto final.....	14
4.5.4 Control de Contaminación.....	15
4.6 Protocolo para la determinación de Bioinsecticida a base de Baculovirus....	16
4.6.1 Bioensayos.....	17
V. MATERIALES Y METODOS.....	18
VI: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
VII. CONCLUSIONES.....	30
VIII. RECOMENDACIONES.....	31
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	32
X. ANEXOS.....	33

## **AGRADECIMIENTO**

Esta investigación no hubiera sido posible sin el apoyo de aquellas personas que me brindaron su ayuda directa e indirectamente en mi desarrollo social y profesional, en especial a:

Mi tutora: Msc. Carmen Marina Rizo que con sus conocimientos, paciencia, esfuerzo y dedicación ha hecho posible la culminación de esta investigación.

Al personal del Laboratorio: Lic. Ivania Baca, Lic. Mirna Ortiz y a la señora Conny Reyes, por brindarme su ayuda y conocimientos para concluir con dicha investigación.

## **DEDICATORIA**

Dedico esta investigación a:

**Dios:**

Por brindarme la fuente de vida que todos necesitamos.

**A mi Madre:**

Por brindarme su apoyo incondicional en todas y cada una de las facetas de mi vida.

**A mi esposo:**

Por su orientación y esmero en transmitirme lo esencial e importante que es la educación para el buen desarrollo del ser humano.

**A mi hijo:**

Por ser la fuente de mi inspiración para superarme cada día.

## RESUMEN

El control de calidad de la producción es esencial para asegurar un procesamiento estándar, para probar la seguridad del producto. Los dos aspectos esenciales para ello, son los métodos de producción y el reconocimiento de organismos contaminantes. En este sentido este estudio se realizó para determinar la calidad de la producción del Virus de la Poliedrosis Nuclear realizada en el Laboratorio de Producción de Virus del Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos de la UNAN-León. Los objetivos fueron determinar la calidad del inóculo usado en la reproducción del virus; determinar la concentración de CIP del producto final formulado en líquido y de las Larvas Equivalentes (LE) producida; estimar la virulencia del virus producido y de su potencia biológica a través de bioensayos, determinando la  $DL_{50}$  como un indicativo. El estudio se realizó en varias etapas: primero se estableció un ensayo donde se probaron 6 tratamientos con 4 repeticiones. Los tratamientos fueron: inóculo viral mantenido en congelación antes de usarse por 15 días y 7 días, inóculo que antes de usarse se ha congelado y descongelado por 15 días y 7 días consecutivos, inóculo viral usado normalmente en la producción del laboratorio y finalmente, el inóculo seleccionado de larvas muertas grandes y de color cremoso, antes del proceso de melanización para la producción. Para estimar la potencia relativa se realizó un bioensayo con larvas de segundo instar larval y se determinó la  $DL_{50}$ . Se determinó la concentración mediante el conteo de CIP usando una cámara Neubauer en un microscopio de contraste de fase. Los resultados indican que la cepa de VPNSe mantiene la misma patogenicidad y virulencia, de 118.980CIP; la calidad del inóculo usado en la producción no mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, pero se observó una tendencia a aumentar la presencia de contaminantes durante el proceso de producción. En el tratamiento donde se utilizó la solución viral congelado y descongelado por 15 días la mortalidad por bacterias fue de 20% y en el tratamiento 5 donde se utilizó la solución viral usada en la producción que fue de 19%. Los rendimientos encontrados de CIP/Larva están por debajo del estándar internacional siendo estos del orden de  $10^7$  y  $10^8$ CIP/Larva.

## I. INTRODUCCIÓN

El Virus de la Poliedrosis Nuclear, es uno de los microorganismos con mayor potencial para ser usados como bioinsecticidas para el control de plagas de importancia en diferentes cultivos. Los VPN y los Virus de la Granulosis, de la familia de los Baculoviridae, han sido los más estudiados con la finalidad de obtener insecticidas biológicos (Moscardi, 1991). El virus de la poliedrosis nuclear de *Heliothis spp* fue el primer bioinsecticida desarrollado comercialmente en los EEUU en el año 1975 (Couch, and Ignoffo, 1981), otras virus aislados de especies plaga han sido desarrollados en diferentes países como bioinsecticidas; esto se debe a la reducida virulencia en otros hospedantes, su alta especificidad y seguridad para los vertebrados (Burges, 1981).

En Nicaragua, la UNAN-LEÓN es la única institución que produce VPN. El Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos, CIRCB, a través del laboratorio de Virus, ha desarrollado y adaptado metodologías para la producción de Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN). Actualmente se producen virus de las especies *Spodoptera exigua*, *Spodoptera sunia* y *Spodoptera frugiperda* y se usan como bioinsecticidas para la regulación de estas plagas.

El desarrollo de estos bioinsecticidas en la UNAN ha pasado por diferentes fases, desde el aislamiento en 1987-1990, el desarrollo de métodos de producción del hospedante y del virus, así como, la efectividad contra las plagas hasta el desarrollo de formulaciones para utilizarse en condiciones de campo. Sin embargo, no se ha hecho hasta la fecha la evaluación de riesgos y no se cuenta con un protocolo de control de calidad ni del proceso de producción ni del producto final.

Es necesario determinar y optimizar todos los factores involucrados en la relación virus-hospedante-ambiente que influyen tanto en la cantidad como en la calidad del patógeno producido. El control de calidad de la producción de VPN, es esencial por lo tanto para asegurar un procesamiento estándar y probar la seguridad del producto. (Burges, 1981).

Sin embargo, a pesar que en el laboratorio de producción de la UNAN lleva un registro de la cantidad de virus producido por día y por mes, no se efectúa el control de calidad ni del proceso, ni de la concentración en CIP/dosis.

Este estudio pretende por tanto, obtener información que sirva de base para la toma de decisiones durante el proceso de producción, en particular se realizarán estudios sobre la calidad del inóculo, la virulencia y la concentración del producto final. Esta información permitirá conocer la calidad de la producción que se realiza a escala semi-industrial en el laboratorio. Para de esta manera utilizar dicho insecticida biológico en los cultivos con la seguridad de la eficacia del producto. Con dichas perspectivas se desarrollo este trabajo para determinar la calidad del inóculo, patogenisidad y virulencia, así como evaluar la concentración final de la dosis necesaria para regular las poblaciones de *Spodopera exigua*.

## II. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar la calidad de la producción del Virus de la Poliedrosis Nuclear realizada en el Laboratorio de Producción de Virus del Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos de la UNAN-LEÓN con el fin de establecer un procedimiento estándar en la producción del virus

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la patogenicidad y virulencia (potencia biológica) del producto por medio de bioensayos con larvas de *Spodoptera exigua*.
2. Estimar la calidad del inóculo utilizado en la producción de virus sometido a continuos períodos de congelamiento y descongelamiento
3. Determinar la concentración de CIP por larva y dosis del producto final y comparar con el patrón nacional e internacional (estándar internacional).



### **III. HIPOTESIS DE INVESTIGACIÓN**

1. El inóculo utilizado para la producción de VPNSe sometido a continuos descongelamiento no afecta la calidad de la producción de LE.
2. El Virus producido (VPNSe) mantiene la misma calidad en relación a los parámetros de patogenicidad, virulencia y concentración de unidades virales (CIP).

## **IV. MARCO TEORICO**

### **4.1 Aspectos generales**

Los virus entomopatógenos utilizados para el control de plagas pertenecen a la familia Baculoviridae. Esta familia es la más estudiada hasta el momento, por reunir excelentes características y seguridad para la salud humana por ser específicos para invertebrados.

#### **4.1 Clasificación del Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN)**

La clasificación y nomenclatura usada para los principales grupos de virus afectando insectos fue definida por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (Payne y Kelly, 1981). El virus de la poliedrosis nuclear pertenece a la Familia Baculoviridae, Género Báculo virus y al Grupo A: Poliedrosis Nuclear (VPN).

#### **4.2.1 Morfología**

Tradicionalmente los virus patógenos de insectos han sido divididos en dos grupos amplios: a) aquellos virus asociados con cuerpos de inclusión proteináceos (CIP), incluyendo los baculovirus ocluidos (virus de la poliedrosis y de la granulosis), virus de la poliedrosis citoplasmática y entomopoxivirus; y b) aquellos que no tienen cuerpo de inclusión. Esta clasificación ha sido usada con criterios morfológicos obtenidos por microscopios electrónicos y de luz (Payne y Kelly, 1981).

Los virus de la poliedrosis están compuestos internamente por una capa de proteína llamada cápside que rodea o protege al ácido nucleico, que representa la porción biológica del virus, pudiendo representar al ADN o ARN. A este conjunto se le denomina nucleocápside. Estas pueden estar solas o en grupos de una envoltura lipoproteica constituida a partir del material celular del insecto parasitado. Al conjunto de nucleocápside más la envoltura se le denomina virión o partícula viral, siendo esta la unidad infectiva del virus. Los viriones están envueltos por una matriz proteica formando el cuerpo de inclusión poliedral, (CIP).

#### **4.2.2 Modo de acción y sintomatología**

Los virus contaminan a los insectos por vía oral, normalmente son ingeridos con los alimentos en los tallos y hojas. La ruta primaria de ingreso del virus al huésped es la vía del tracto alimentario durante el curso de alimentación, especialmente para las larvas y adultos. La contaminación a través de los huevos de los insectos es una posible vía interna y externa por contaminación del corium, la cual es más frecuente. De modo que la contaminación de larvas de recién nacidos es facilitada por el hábito de comer de los virus. Después de la ingestión el alimento se mueve directamente al intestino interno, dándose los siguientes pasos:

En el intestino se disuelve la proteína (poliedro en el medio alcalino (pH mayor 7.5), se libera la partícula viral o virión, esta se fusiona con la membrana de la célula del intestino y penetran las nucleocapsides a las células. Se transporta al núcleo, se desprende la cápside y se libera el ADN. Este es la plantilla perfecta para replicar el ADN (genoma viral), el virus toma el control de los mecanismos para la producción de macromoléculas (polipéptidos y ácidos nucleicos) y los utiliza para la producción de nuevas partículas virales. La progenie se libera en el hemocele y pasa de una célula a otra. El insecto se convierte en un saco de virus y ocurre la muerte del insecto con la consiguiente rotura del integumento, su liberación y dispersión.

Los principales tejidos afectados son: Tejido adiposo, tejido epidérmico, la matriz traqueal, glándulas salivares, tubos de Malpighy y las células sanguíneas. Los síntomas aparecen después del tercer o cuarto día de infección de las larvas. Primero se observan las larvas de color pálido y con manchas oleosas, luego la larva reduce su movilidad, dejan de alimentarse y suben al a parte alta de la planta, después se cuelgan de las hojas de las patas traseras y posteriormente se vuelven oscuras debido a la rotura del tegumento.

#### **4.3. Métodos de producción de Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN)**

Uno de los aspectos a considerar en la producción de los virus entomapatógenos es la obtención del máximo posible de material viral biológicamente activo al menor costo posible. Existen diferentes métodos, que se describen a continuación.

### 4.3.1 Producción *in Vitro*

Desde la descripción de las primeras técnicas para el cultivo de células de insectos realizada por Grace (1962), citado Lecuona, se ha pensado en la producción en escala comercial utilizando estos métodos, pero hasta el momento, ninguna virosis ha sido producida en estas condiciones para uso comercial. Cuando se compara la producción de Virus sobre larvas vivas y la producción en cultivo de células, esta última tiene la ventaja de permitir mejor control de la calidad del producto, porque el virus es producido en un sistema libre de contaminantes y por otro lado, son pocas las horas - hombre requeridas en el proceso de producción. Lecuona menciona, entre otras razones, que los avances en esta área no han sido significativos porque la producción en cultivo de células no es suficiente para muchos de los sistemas hospedante-virus con perspectivas de utilización (Lecuona, 1996).

Los sistemas de producción de VPN *in vitro* han mostrado ciertas ventajas sobre las técnicas *in vivo*, ellas son:

1. No es necesario mantener la colonia de insectos para el suministro de larvas para la producción del virus. Los cultivos celulares se pueden preparar con tiempo y mantenerse congelados hasta que se requieran.
2. El producto obtenido de los sistemas *in vitro* salen más limpios debido a que no contienen partes de insectos, contaminación microbiana o dieta artificial para insectos.
3. Los sistemas *in vitro* tienden a requerir menos trabajo, haciéndolo más fácil de escalar para producción comercial.
4. Los sistemas de producción *in vitro* están abriendo la posibilidad de producción de virus recombinantes, los cuales han sido alterados genéticamente para incrementar su efectividad en el control de insecto. Estas modificaciones se deben de hacer para mejorar la venta comercial del VPN como agente de control de plagas, mediante la superación del rango de hospederos o el incremento en su velocidad para matar (Behle y Tamez Guerra, 2003).

Los sistemas de producción *in vitro* también tienen desventajas comparados con sistemas *in vivo*.

1. Los costos del equipo y medio de cultivo son altos, los reactores biológicos son más modernos que los tanques de fermentación comúnmente empleados para la

producción comercial de muchos microorganismos, tales como bacterias y levaduras. Los sistemas deben de mantener un alto grado de prevención de la contaminación al igual que el mantener unas condiciones de fermentación altamente controlada. En suma los costos totales son altos.

2. Si además se requiere de un medio caro para el cultivo de células, los costos se elevan todavía más y rápidamente los sistemas de producción de VPN se volverán prohibidos como para ser empleados como agente bioinsecticidas (Behle y Tamez Guerra, 2003).

#### **4.3.2 Producción in Vivo**

La producción de virus entomopatógenos *in vivo*, con la utilización del hospedante original, es la práctica más utilizada y se puede realizar tanto en el campo como en condiciones de laboratorio (Lecuona, 1996).

##### **4.3.2.1 Producción de campo**

Las primeras prácticas o ensayos, se realizaron para coleccionar insectos infectados y llevarlos a cultivos, en un esfuerzo de inducir infecciones epizooticas del insecto plaga. El virus multiplicado por este método permite disminuir los costos de producción utilizando material de bajo costo recolectado directamente del campo. Este método ha sido utilizado para la producción de virus de poliedrosis nuclear de *Neodiprion sertifer* (Hymenoptera: Tenthredinidae) y *N. swaineri* y *Anticarsia gemmatilis* (Moscardi, 1998). Por otro lado, representa una alternativa viable en el caso de no existir técnicas conocidas de cría, principalmente en los estadios iniciales o cuando existe mortalidad elevada en los primeros estadios larvales. En este caso es muy importante controlar la calidad del material que se recoge, coleccionando únicamente aquellas larvas que presentan los síntomas típicos de la enfermedad

##### **4.3.2.2 Producción en laboratorio**

Más recientemente, las prácticas de producción de insectos se han conducido para producir un gran número de insectos susceptibles, para que favorezcan el desarrollo de la enfermedad. Ignoffo, 1981, describió este tipo de sistema de producción de VPN usando *Helicoverpa zea* o *Heliothis virescens*. Desde entonces, poco se ha cambiado de

esta técnica básica para los sistemas de producción *in vivo* para una gran variedad de insectos. (Behle y Tamez-Guerra, 2003).

Para realizar la producción del virus en laboratorio, existe la necesidad de disponer de una cría masiva del hospedante susceptible, con todas las etapas de cría, inoculación, y producción sincronizadas entre si, para mantener un flujo continuo con el proceso de producción. Las instalaciones para producir virus deben de estar apartadas y aisladas de las salas donde se realiza la cría masal y de los laboratorios donde se elabora la dieta. El personal que manipula material contaminado con virus no debe tener acceso a las salas de cría. En general los sistemas de producción *in vivo* requieren de cinco pasos o etapas básicas y tres etapas de manejo del producto final:

1. La producción del sistema inicia con la selección, establecimiento y mantenimiento de una colonia de insectos saludables. Esta colonia va proveer de los estadios de vida adecuados.
2. Los sistemas de producción eficiente requieren que el insecto alcance un estadio de crecimiento específico. Con el objetivo de incrementar el rendimiento potencial de virus por individuo, las larvas juveniles de insectos se dejan crecer por varios días, y generalmente se alimentan de una dieta artificial, para que aumente de tamaño antes de la incubación.
3. Los métodos de inoculación deben ser adecuados para la especie de insecto utilizado para producir la virosis. La inoculación se realiza incorporando una suspensión del virus en la dieta, en el momento que la misma se encuentra con una consistencia todavía líquida durante su enfriamiento. La temperatura debe estar próxima a los 50° C, ya que en ella gran parte de las partículas virales conservan su actividad. La incorporación de la suspensión viral en la dieta posee la ventaja de facilitar la ingestión de las partículas de virus por la larva, evitar la contaminación elevada del ambiente donde se realiza la inoculación y según Dulmage et al (1970), citado por Lecuona, 1996, pueden ser alcanzados por niveles más elevados de producción de virus. El momento para realizar la inoculación depende de la especie y el sistema de cría.

4. La incubación generalmente consiste en la exposición del insecto al virus seleccionado. Los insectos son incubados o expuestos al virus para iniciar el ciclo de la enfermedad. Esto se realiza al permitir que las larvas se alimenten de comida contaminada con el virus. (Lecuona, 1996). El período de incubación esta intrínsecamente relacionado con la temperatura. Para muchas especies existe un intervalo de temperatura óptima para la replicación del virus, cuando se realiza la incubación en el límite superior de ese óptimo, es posible obtener el máximo de producción en un período de incubación menor. Las temperaturas superiores de ese óptimo, puede inhibir o retrasar la replicación del virus prolongando el período de incubación y por otro lado, la eficiencia de producción también puede resultar comprometida (Behle y Taméz Guerra, 2003).
5. Después de la incubación se deja que el ciclo de la enfermedad progrese dentro de un período de incubación, el cual termina con la producción del poliedro viral.
6. Una vez que se completa el ciclo de la enfermedad, los poliedros se cosechan y procesan para obtener el producto final (Bahle y Tamez Guerra, 2003). La colecta debe de ser realizada cuando la mayor parte de los hospedantes han muerto recientemente, para obtener un mayor aprovechamiento de los tejidos del insecto. En el caso de las virosis que provocan una ruptura rápida del tegumento del insecto (como *Heliothis*, *Spodoptera sp* y otros) es conveniente coleccionar los insectos infectados próximos a su muerte, para evitar pérdida del virus producido. Otra manera de coleccionar, consiste en colocar los recipientes con los insectos ya muertos a bajas temperaturas para congelamiento del material y posteriormente realizar la colecta (Lecuona, 1996).
7. Almacenamiento. La conservación de la actividad biológica de los Baculovirus esta estrechamente relacionada con la temperatura de almacenamiento. El tiempo de almacenamiento óptimo varía con las diferentes formulaciones.
8. Formulación. El proceso de formulación debe preservar la actividad biológica y conferir al producto características de estabilidad durante su almacenamiento, capacidad de permanecer en suspensión en la mezcla de tanque, facilidad de aplicación, y favorecer una cobertura apropiada, teniéndose siempre en cuenta que

los virus actúan por vía oral. La mayor parte de esfuerzos para encontrar formulaciones adecuadas han sido realizados por el sector privado; por lo tanto, la mayor parte de la información existente no está disponible públicamente (Lecuona, 1996).

#### **4.4 Factores a considerar para maximizar la producción de virus**

##### **4.4.1 Hospedante**

Diversas especies presentan hábitos caníbales y requieren recipientes de cría que mantengan la individualidad. Otros solo presentan estos hábitos cuando las poblaciones exceden ciertos niveles críticos por unidad de área de volumen. Y otras especies presentan comportamiento gregario en determinadas fases de su crecimiento o no presentan canibalismo, aún en condiciones de densidad elevada; este aspecto es muy importante y debe ser considerado en énfasis en las técnicas de cría.

Para que sea posible obtener una eficiencia elevada de conversión de tejido en partículas infectivas, son necesarios estudios que determinen condiciones apropiadas para el rendimiento máximo de producción (Moscardi, 1986).

##### **4.4.2 Inóculo**

La dosis utilizada en la inoculación debe ser tal que permita el máximo desarrollo del insecto para un eficiente aprovechamiento de los tejidos del mismo. Para disponer de las dosis necesarias para iniciar la producción, el inóculo original debe de ser multiplicado en una gran cantidad de larvas para poder contar con el inóculo secundario, el que podrá atravesar por un segundo pasaje para obtener inóculo terciario (Matignoni, 1978 citado por Lecuona, recomienda utilizar solamente inóculo secundario o terciario para la producción en gran escala.

También es recomendable mantener submuestras del inóculo, obtenido en las primeras multiplicaciones conservarlas en condiciones óptimas de almacenamiento, para utilizarlas como patrones de referencia en controles de calidad futuros o para reiniciar un proceso de producción. El inóculo primario, con el cual se inicia el proceso de producción debe de estar libre de contaminantes y multiplicado in vivo o in vitro. Los contaminantes puede ser reducidos por centrifugación en gradiente de sacarosa o



mediante la utilización de la solución de Roccal (250 ppm) para reducir las bacterias formadoras de esporas sin afectar al virus (Lecuona, 1996).

El inóculo debe de estar libre de ciertos contaminantes como coliformes y bacterias patógenas primarias (Salmonella, Shigella y Vibrio). Debido a la variabilidad genética que existe entre los aislamientos de baculovirus que atacan a una misma especie, la selección del patotipo con mayor actividad biológica, es fundamental para obtener productos de calidad elevada.

#### **4.4.3 Ambiente**

Los factores que afectan la cría masal del insecto también afecta la producción del virus. Entre estos factores, los más evidentes son: Componentes de la dieta desbalanceados en cuanto a calidad y cantidad, temperatura y humedad inadecuada, aireación inapropiada y otras causas de estrés.

##### **4.4.3.1 Dieta**

Una dieta adecuada permite obtener viables en el menor tiempo posible y gran volumen de tejido disponible para la replicación del virus. Para aumentar la eficiencia de producción es necesario realizar estudios para aquellas especies cuyos métodos no han sido previamente ajustados. La dieta debe ser en lo posible estandarizada, constante e ideal para las sucesivas generaciones.

##### **4.4.3.2 Temperatura**

En general, la producción de virus se realiza entre los 20 y 26<sup>0</sup> C. Sin embargo, cada sistema de producción requiere su temperatura apropiada. Los parámetros considerados para evaluar el efecto de la temperatura por lo general son: Mortalidad del hospedante, producción de virus por peso de larva o recipiente utilizado en el proceso de incubación, tiempo de infección letal y virulencia del virus obtenido.

##### **4.4.3.3 Humedad**

La humedad debe de ser regulada de acuerdo con el hospedante utilizado en la producción de virus. Un exceso de humedad puede provocar un efecto estresante y en muchos casos, esta condición favorece la proliferación de enfermedades provocadas por hongos, bacterias o protozoarios. En general, la humedad tiene un efecto insignificante

sobre la replicación del virus. En los sistemas de cría, la humedad debe de ser mantenida entre 60 y 80% para evitar una rápida deshidratación de la dieta, la cual interfiere en la actividad alimentaría de las larvas, reduciendo la infección por el virus.

#### **4.4.3.4 Flujo de aire**

El mantenimiento del aire raramente es controlado en las cámaras de incubación, sin embargo, puede ser de importante para evitar otras causas ajenas a la virosis que se pretende multiplicar. La aireación inadecuada impide la evaporación, provocando la concentración de agua en la dieta en el ambiente, lo que puede ocasionar estrés nutricional y favorecer la incidencia de bacteriosis.

#### **4.4.3.5 Recipientes**

La elección del recipiente de cría esta condicionada al comportamiento, tamaño del hospedante, densidad de la población y costo. En el interior del recipiente, las condiciones de microclima deben de ser adecuadas para obtener el máximo de biomasa y consecuentemente, maximizar la producción de virus (Lecuona, 1996).

### **4.5 Control de calidad**

La calidad de forma general se define como un conjunto de propiedades y características de un producto que le confiere estar apto para satisfacer las necesidades a las cuales va dirigida. (Burges, H. D. 1981)

El control de calidad permite la corrección de los problemas de actividad originados en el proceso de producción que son elevados, la homogeneización del material puede ser deficiente, por lo tanto, el muestreo y control de calidad de cada lote producido permiten comprobar y asegurar la eficiencia del bioinsecticida que llega al mercado y se requiere para asegurar la viabilidad y efectividad del producto final.

Una medición básica de productos a base de virus es el número de CIP por volumen (líquido) o masa (peso seco). Se puede determinar este valor por medio de conteos en el hemocitometro con la ayuda de un microscopio o con contadores mecánicos como el Coulter Counter<sup>R</sup>. Aunque esta es una medida importante, el conteo no garantiza la actividad insecticida, la cual es mejor determinarla por bioensayos estándares. Las técnicas para realizar bioensayos efectivos pueden variar mucho entre los laboratorios y

posiblemente debería de ser estandarizada con la finalidad de hacer comparaciones reales (Van Beek y Hughes, 1998 citado por Bahle y Tamez Guerra, 2003). De cualquier forma, se tiene que encontrar una técnica adecuada y emplearla en forma regular para verificar la actividad insecticida del producto.

El mantener la naturaleza del virus es otro de las preocupaciones del control de calidad. Generalmente, se pueden emplear técnicas bioquímicas, tales como ensayos con enzimas de restricción para la digestión del ADN viral y electroforesis, para comparar el genoma del virus producido contra el estándar y poder verificar en forma positiva la naturaleza del producto (Bahle y Tamez-Guerra, 2003).

Generalmente se realiza control de calidad en tres niveles, producción, durante el proceso y al producto final:

**4.5.1 Control de la producción:** Es el seguimiento de la ejecución de todas las operaciones, procedimientos, equipos y condiciones ambientales de producción, con el objetivo de mantener el rendimiento.

**4.5.2 Control de proceso:** Seguimiento de la calidad del producto no terminado, como puede ser la detección de contaminantes.

**4.5.3 Control del producto final:** Seguimiento de la calidad del producto final.

La estandarización tiene por finalidad evitar o minimizar futuros problemas en relación con la actividad biológica de los Baculovirus. En este tópico está implícito el concepto de uniformidad de los diferentes lotes procesados del producto con el objetivo de obtener cantidades homogéneas del agente activo por unidad del producto final. Algunos puntos señalados por Ignoffo (1966), citado por Bahle y Tamez Guerra, 2003, relativos a la estandarización de bioinsecticidas, fueron condensados y se detallan a continuación:

1. Disponer de un patrón de referencia de cada especie de virus.
2. Todas las formulaciones virales deberán ser comparadas con el patrón de referencia y explicitar la actividad en términos del patrón, sobre una base de cría de unidades de actividad por unidad de peso o de volumen.

3. La mortalidad debe de ser usada como reflejo de la actividad, determinándose esa mortalidad siguiendo métodos estrictos y definidos para compatibilizar resultados.
4. La actividad insecticida deberá ser expresada en unidades de inclusión (CIP o gramos de insecticida, relacionada directamente a  $CL_{50}$  o  $DL_{50}$  con sus respectivos límites de confianza.

#### **4.5.4 Control de contaminación**

El primer aspecto que debe de ser considerado para evitar la proliferación de contaminantes y facilitar su control, es la disponibilidad de instalaciones apropiadas para la cría e incubación de los insectos inoculados. Las paredes deben ser revestidas y pintadas con material no porosos que permitan la utilización de desinfectantes y la realización de lavados frecuentes.

El desinfectante más utilizado en los laboratorios de patología de insectos es el hipoclorito de sodio por su amplio espectro de actividad, disponibilidad, seguridad de uso y estabilidad en suspensión acuosa. Por otro lado, se debe considerar que el personal que manipula la cría es fuente de contaminación primaria. En general, los niveles de contaminación están relacionados directamente con al actividad y el número de personas que trabajan en las salas de cría.

En la etapa de elaboración de la dieta también es importante intervenir colocando anticontaminantes en ella. Las comúnmente utilizadas son: Clorotetraciclina, Formaldehído, Metilpatrahidroxibenzoato, Benzoato de sodio, ácido sórbico y sus sales. La prevención de la contaminación por bacterias debe ser realizada adicionando antibióticos para evitar la interferencia de estos compuestos en la calidad del insecto deberán ser utilizadas las mínimas dosis efectivas, evaluando los aspectos biológicos de interés para cada combinación de especie hospedante y dieta. El cumplimiento de una rutina de limpieza de los laboratorios con hipoclorito de sodio (50%), previene la contaminación de manera eficiente, complementadas con otras formas de asepsia. El alcohol no es recomendado para disminuir contaminaciones por virus y algunas bacterias.

Las crías másales pueden ser afectadas por la presencia de patógenos que causan enfermedades crónicas y con síntomas poco manifiestos. Para las contaminaciones provocadas por hongos y bacteria, Alves (1986), recomienda mantener las salas de crías ventiladas, eliminar los focos iniciales de la enfermedad y evitar las variaciones de temperatura. Los cuidados de asepsia y desinfección se deben mayor en el caso de utilizar dietas naturales.

Las contaminaciones provocadas por protozoarios pueden ser controladas eliminando todas las larvas con síntomas (movimiento lento, tegumento opaco, presencia de cuerpos blancos, amarillentos o blanco lechosos en la cavidad del cuerpo) que deben de ser comprobados por exámenes microscópicos de la hemolinfa para observar la presencia de algunas de sus fases.

Existen casos, en los cuales es recomendable la eliminación de las poblaciones contaminadas y reiniciar una nueva colonia después de lavado y desinfectado rigurosamente todos los utensilios, instalaciones y cámaras de cría.

#### **4.6 Protocolo para la determinación de la calidad de bioinsecticidas a base de baculovirus**

##### **4.6.1 Ensayos Biológicos para determinar contaminantes**

- a). Recuento de bacterias aeróbicas (no debe exceder  $10^7$  a  $10^9$  colonias por gramo, según el hospedante que se considere).
- b). Recuento de coliformes.
- c). Recuento de patógenos (Salmonella, Shigella y Vibrio).
- d). Recuento del total.

##### **4.6.2 Recuento de cuerpos de Inclusión**

A partir de una solución purificada o una solución viral cruda se realizan diluciones sucesivas, cada solución se agita previamente para preparar la siguiente dilución para asegurar una buena distribución de los CIP. El conteo se realiza usando una cámara de Neubauer, la cual se coloca sobre un microscopio de contraste de fase usando el lente 40x. Luego se realizar el conteo y se estima la población e CIP/ml

**4.6.3 Identificación bioquímica y caracterización genética del ADN viral** con el auxilio de enzimas restricción (patrón estándar de ADN viral) y técnicas de hibridación de ácidos nucleicos, PCR (“Polymerosa Chain Reaction”) o RAPD (“Random Amplified Polimorfhic ADN”).

#### **4.6.4 Bioensayos**

De todos los aspectos que deben tomarse para la certificación de la calidad de un bioinsecticida, sin duda el más importante es el bioensayo, y aunque laborioso y costoso resultan, hasta el momento, la única forma certera de validar la calidad de un producto para estos fines. Muchos han sido y son los intentos para hallar marcadores indirectos que permitan obviar estas pruebas; sin embargo, ninguna puede dar datos exactos y en todos los casos debe corroborarse con el bioensayo correspondiente.

Otros aspectos importantes es la estandarización de estas pruebas, para lo cual es necesario tener en cuenta en primer lugar el mecanismo de acción del virus sobre el objeto de control. Resulta importante seleccionar el blanco adecuado así como las condiciones en la que se va a replicar la prueba. La preparación de las muestras que se van a ensayar, así como el análisis a que se van a someter influyen en los resultados que se obtengan.

El método además debe ser lo mas sencillo posible, y sobre todo con fácil repetibilidad. Los patrones estándares de referencia deben estar bien conservados y su verificación es una premisa para la validación de las producciones. Debido a la diversidad y a la variabilidad en el espectro de acción de los diferentes microorganismos que se utilizan para estos fines e incluso la especificidad de algunos sobre determinadas especies. Los aspectos que deben tenerse en cuenta en el bioensayo son el mecanismo de acción del bioinsecticida, el insecto hospedero, la preparación de la muestra, la repetibilidad y la conservación y verificación de los patrones.

La teoría del bioensayo se refiere a aplicar una dosis conocida de micro insecticida sobre un número de insectos, por tanto se trata de un efecto todo o nada, y el resultado se expresa como el porcentaje de la mortalidad. Se ha discutido la posible implicación de otros efectos como el tiempo en que demoran en morir pero estos resultan más difíciles para interpretar.

Se ha logrado mucha información trabajando con un rango de dosis, en este caso cuando se grafica la mortalidad aparece una curva en forma de S, la cual, se aproxima a una línea recta cuando el porcentaje de mortalidad se lleva a una escala probit (%) y la dosis a logaritmo. La línea recta se obtiene de los valores medios de los resultados.

De esta forma se puede determinar los valores de  $LD_{50}$ , así como la potencia de un biopreparado a partir de la comparación con un patrón conocido

## V. MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en el laboratorio de producción de virus del Campus Agropecuario de la UNAN-León, ubicado a 1200 mts. Carretera a La Ceiba, Municipio de León, desde octubre del 2003 a diciembre del 2004. Este estudio se realizó en varias etapas, ellas son:

### **1. Determinación de la patogenicidad y virulencia (potencia biológica) del virus**

#### **1.1 Obtención de Larvas Equivalentes**

Diariamente se infectaron 50 larvas de *Spodoptera exigua* hasta completar un total de 500 larvas infectadas. El procedimiento para la infectación fue el utilizado en el laboratorio, usando larvas del tercer estadio larval y una concentración de virus de  $10^5$  CIP/ml. Después del tercer día de infectadas se chequearon las larvas dos veces al día con el objetivo de seleccionar aquellas larvas recién muertas por virus y que presentaron color blanquecino y de un tamaño de una larva muerta en el último estadio larval.

Cada larva cosechada con las características descritas fue almacenada en el frizeer rotuladas con la fecha de inoculación, cosecha, número de larvas equivalentes y especie. De estas larvas cosechadas se seleccionaron 30 larvas, las cuales fueron usadas preparar la solución madre y determinar la potencia viral a través de los bioensayos.

#### **1.2 Preparación del virus**

Se seleccionaron 30 larvas equivalentes (LE) producidas en la etapa anterior. Estas se maceraron, se le agrego un poco de agua destilada y detergente analítico, SDS (Sodio Duodecil Sulfato) al 1%, y se filtro a través de tela de organdí, el caldo obtenido se coloco en tubos de ensayos para someterlos a un proceso de centrifugación diferencial para separar el virus de las partículas del cuerpo de la larva.

#### **1.3 Semipurificación del virus**

La solución viral obtenida se colocó en los tubos de ensayos y se centrifugó por un minuto a 3000 rpm. Como resultado se obtuvieron dos soluciones, un sobrenadante y un precipitado, éste se descartó y el sobrenadante se volvió a centrifugar por 10 minutos a 6000 rpm. Nuevamente se obtuvo un sobrenadante y un precipitado, el sobrenadante se



descartó y el precipitado es el que contenía los CIP, luego a éste se le agregó 1.5 ml de agua destilada, se agito y se paso a un vial.

Posteriormente, se rotuló con toda la información necesaria como fecha de realización y número de larvas semipurificadas. La solución obtenida es llamada solución madre a partir de la cual se elaboraron las diferentes dosis de virus.

#### **1.4 Determinación de la concentración de virus.**

A partir de la solución madre se hicieron tres diluciones sucesivas, 1:10; 1:100; 1:1000. De la dilución 1: 1000 se tomarán 20 microlitros para realizar el conteo. Este se realizó en una cámara de Neubauer el cual se colocó en el microscopio de contraste de fase para realizar el conteo. Se realizó el conteo en cinco cuadros grandes de la retícula de la cámara. El procedimiento se repitió dos o tres veces.

Después de realizar el conteo para determinar la concentración se utilizó la siguiente fórmula:

$$X * 5 * 10^4 * \text{la dilución empleada}$$

Donde:

5 = Cuadros de la solución empleada.

$10^4$  = Profundidad de la cámara.

X = Número promedio de poliedros.

#### **1.5 Bioensayo**

Para realizar el bioensayo se seleccionaron las larvas de *Spodoptera exigua*, provenientes del la cría de Noctuidos del Laboratorio de Control Biológico de la UNAN-LEON. Se usaron larvas del segundo estadio. Previamente se tomó una muestra de 10 larvas y se pesaron para determinar el peso promedio de las larvas.

Para el montaje del bioensayo se prepararon cinco dosis de virus y un testigo a base de agua. El bioensayo se repitió tres veces. Para cada dosis se usaron 50 larvas con un total de 300 larvas por réplica. Conociendo la concentración se prepararon cinco dosis comprendidas entre  $10^2$ ,  $10^8$  CIP.

Se utilizaron micro platos y una jeringa con la que se colocó un ml de dieta artificial en cada orificio del micro plato. Con una micro pipeta se depositó sobre la dieta un microlitro de cada dosis del virus, luego se colocó una larva del segundo instar en cada orificio, se procedió a cubrir con papel absorbente y se tapó con un cubre objeto, luego se selló con un cinta adhesiva. Rotulando la dosis y número de réplica. El bioensayo se inició con el control y se continuó con la dosis más baja hasta concluir con la dosis más alta, para no tener problemas de contaminación.

Después de 24 horas de montado el bioensayo, cada larva que ingirió toda la dieta fue trasladada a recipientes individuales los cuales contenían dieta libre de virus, y diariamente se procedió a chequear la mortalidad o sobrevivencia. Se consideró una larva muerta por virus aquella que al tocarlas se rompía el integumento. Se evaluó por un periodo de 15 días después del traslado individual, hasta la muerte o pupación de la larva.

Los resultados de mortalidad y las dosis se introdujeron en una hoja del SPSS, luego se realizó el análisis PROBIT y se determinó la LD<sub>50</sub>. La DL<sub>50</sub> obtenida de este grupo de larvas fue considerado el patrón, el cual fue usado como referencia para comparar el producto.

El bioensayo se repitió usando las larvas que se utilizaron para la preparación del producto final, virus crudo. Se determinó la DL<sub>50</sub> y la virulencia del producto a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Virulencia del producto UI/ml} = \frac{\text{DL}_{50} \text{ del patrón}}{\text{DL}_{50} \text{ del producto}} \times 1000$$

## **2. Calidad del inóculo**

Se estableció un ensayo con 6 tratamientos y 4 repeticiones en un diseño completamente aleatorio (DCA). Por cada repetición se usaron 40 larvas para un total por tratamiento de 160 larvas.

Se seleccionaron larvas muertas por virus producidas en el Laboratorio y se procedió a preparar la solución viral, adicionando 1.5 ml de agua por cada LE. Este procedimiento se repitió para preparar los tratamiento, que son: 1. Virus mantenido en el freezer

congelado por un período de 15 días antes de usarse; 2. Virus congelado y descongelado a diariamente por 15 días antes de usarse; 3. Virus mantenido en el freezer congelado por un período de 7 días antes de usarse; 4. Virus congelado y descongelado a diariamente por 7 días antes de usarse; 5. Virus seleccionado en el momento de la cosecha por presentar color blanco, antes del proceso de melanización; 6. Virus recién cosechado, usado normalmente en el proceso de producción del laboratorio, el cual se usó como testigo.

Posteriormente, usando un asperjador manual se contaminó la superficie de la dieta con cada tratamiento y luego después de dejar secar la dieta se procedió a colocar una larva de menos de 1.5 cm., tercer estadio larval. Las variables a evaluar fueron mortalidad por VPN, calidad y concentración de virus por tratamiento. Los resultados fueron analizados con un ANOVA de una vía en el paquete estadístico SPSS.

### **3. Determinación de la concentración de CIP/dosis.**

Se procedió como se describió en el ítem 3.3, con la diferencia que se evaluó una dosis de VPN producida en diferentes fechas o lotes de producción. Esta evaluación se realizó por un período de seis meses de producción del laboratorio.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Determinación de la potencia biológica del virus patrón

Al realizar el bioensayo para determinar la potogenicidad y virulencia de la cepa de VPNSe producida en el laboratorio, se observa que el Lote A, producido en febrero del 2004, muestra una  $DL_{50}$  de 118.98093 CIP/ $\mu$ l. Estos datos coinciden con los valores de  $DL_{50}$  registrados para esta cepa en Nicaragua, lo que nos indica que se mantiene la patogenicidad y virulencia de la misma (Rizo *et al.*, 1992).

Tabla 1. Dosis respuesta de larvas de segundo instar de *Spodoptera exigua* infectadas con VPN sin formular, producido en el Laboratorio de virus. CIRCB, 2004-2005.

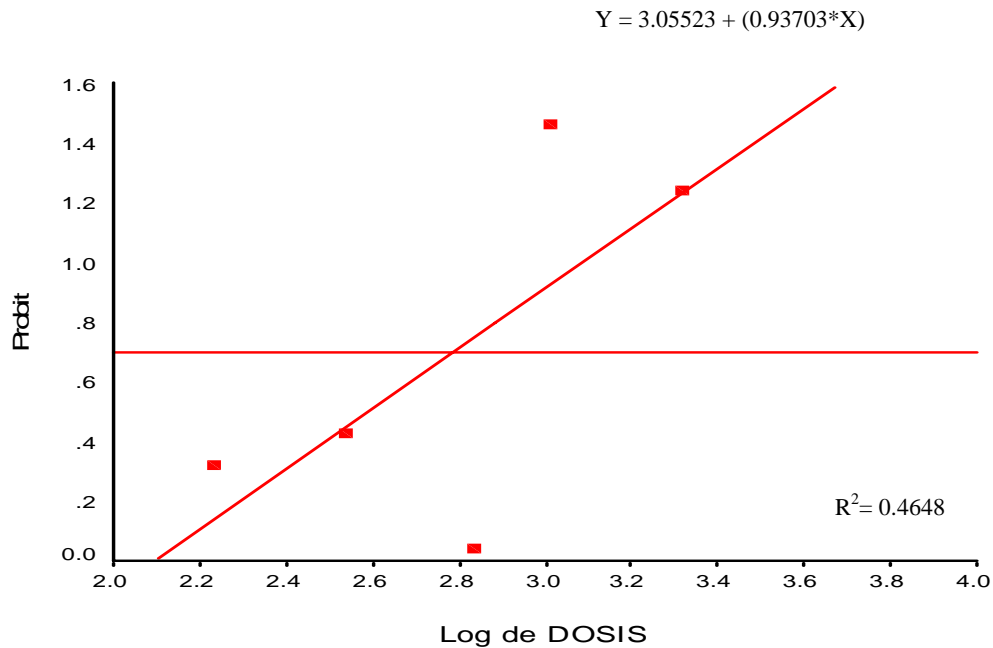
Número de lote	$DL_{50}$	Limite inferior	Limite superior	Pendiente	$X^2$	Coef. regresión
Lote A	118.98093	2.78844	5076.83227	3.05523	30.052	0.937
Lote B	0.00601	0.0000	9800000.0	5.63	10.611	0.28629

Sin embargo, cabe destacar que los valores de la  $X^2$  de 30.05 y la pendiente de la línea de 3.05 son muy altos, por lo que hay poca confiabilidad entre los valores de mortalidad observada y la estimada; cuando el valor de la  $X^2$  es alta significa que los puntos están muy dispersos alrededor de la línea media, tal como se muestra en la Gráfica 1. Por otro lado, el análisis probit señala que los resultados son heterogéneos. Con respecto a la pendiente, lo ideal para productos biológicos debería ser menor de 2.0 (Ibarra y León, 1988).

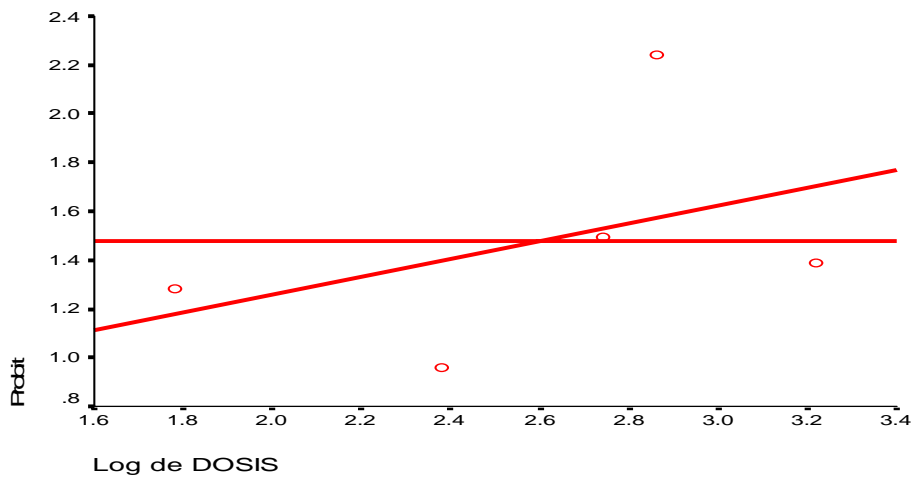
En el caso del lote B, producido en marzo del 2004, como se observa en la Tabla 1 el valor de la  $DL_{50}$  es demasiado bajo y el valor de la pendiente es mucho más alta. Por lo que no se pudo determinar la potencia relativa.

La heterogeneidad de los datos de ambos lotes, posiblemente fue causada por la contaminación registrada en ambos bioensayos. El segundo bioensayo registró sin

embargo, una mayor contaminación por VPN y por otras causas debido a las condiciones ambientales no adecuadas.



Gráfica 1. Ecuación de la línea y respuestas transformadas por probit de larvas de segundo instar de *Spodoptera exigua* sometidas a diferentes dosis de VPN sin formular (lote A). Campus Agropecuario, 2004.



Gráfica 2. Respuestas transformadas por probit de larvas de segundo instar de *Spodoptera exigua* sometidas a diferentes dosis de VPN sin formular (lote B). Campus Agropecuario, 2004.

### I. Determinación de la calidad del inóculo utilizado en la producción de virus.

Como se observa en la Tabla 2, en los tres primeros tratamientos la solución viral usada presentó una concentración inicial del orden de  $10^7$  y  $10^8$  CIP/ml, lo que indica que se

encuentran por debajo del estándar establecido. Mientras que, los tratamientos 4, 5 y 6 mostraron una concentración inicial en la solución viral del orden de  $10^9$  y  $10^{10}$  CIP/ml, lo que corresponde al estándar internacional (Alves, 1986). Esto puede ser debido a que la cosecha de larvas muertas por virus no es uniforme, pues las larvas mueren de diferentes tamaños. En parte porque el inóculo usado no tiene una concentración adecuada y por otro lado, la edad de las larvas usadas en el passage tampoco es uniforme. Lo que nos indica que uno de los criterios importantes para el control de la calidad de la producción del virus es el tamaño y la edad de las larvas usadas en la infestación y la concentración del inóculo

Tabla 2. Concentración en CIP de cada solución viral usada en los tratamientos del ensayo calidad del inóculo. Lab. Producción de Virus. CIRCB. 2004.

<b>Tratamiento</b>	<b>Nº LE/T</b>	<b>Concentración</b>
<b>T1:</b> 15 días congelado	75	$9.95 \times 10^7$
<b>T2:</b> 15 días congelar y descongelar	75	$1.85 \times 10^8$
<b>T3:</b> 7 días congelado	75	$1.29 \times 10^8$
<b>T4:</b> 7 días congelar y descongelar	75	$4.05 \times 10^9$
<b>T5:</b> Virus con larvas seleccionadas	75	$1.55 \times 10^9$
<b>T6:</b> Virus recién cosechado (testigo)	75	$1.72 \times 10^{10}$

Estos hechos fueron señalados por Hunter, *et al*, 1984, que encontró que el rendimiento de CIP por tamaño larval declina hasta 8300 en larvas de primer instar a 1300 para larvas de quinto instar larval en la especie *Mamestra brassica*.

Otro aspecto a señalar es el hecho que, actualmente, se utilizan dos larvas pequeñas como equivalente a una LE para elaborar una dosis de VPN, pero se desconoce si las dos larvas pequeñas son equivalentes en términos de concentración de CIP/larva a una LE grande, se requiere por tanto encontrar la relación del peso larval y la concentración

de CIP por gr de peso de larvas muertas en diferentes instares, que permita elaborar la dosis con la concentración adecuada para la aplicación en un cultivo

Tabla 3. Mortalidad causada en larvas de *Spodóptera exigua* infectadas por diferentes soluciones virales sometidas a congelamiento y descongelamiento. LCB-CIRCB, 2004.

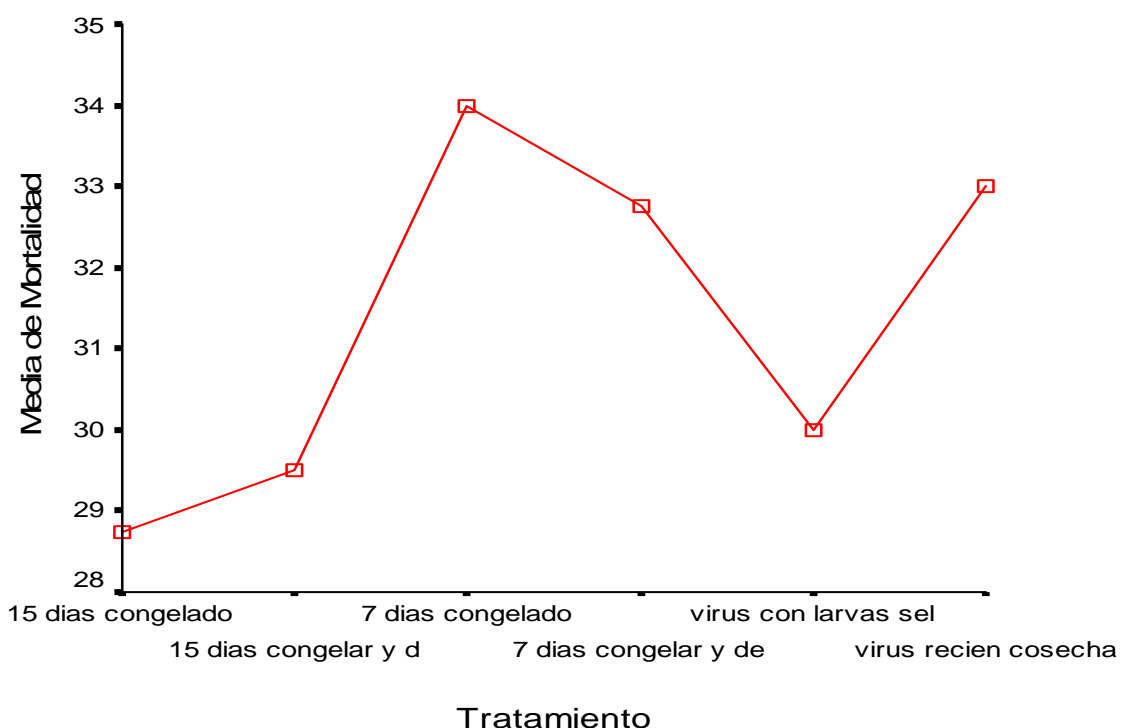
Tratamientos	% de mortalidad		
	VPN	Bacterias	Pupa
1. Solución viral congelado por 15 días	126	4	
2. Solución viral congelado y descongelado por 15 días	119	<b>20</b>	
3. Solución viral congelado por 7 días	136	13	0
4. Solución viral congelado y descongelado por 7 días	131	9	0
5. Solución viral usada en la producción	120	<b>19</b>	3
6. Solución viral preparada el día de inocular y de LE antes de melanización	132	10	0

Como se observa en la Tabla 2 y 3, no se detectaron diferencias entre los tratamientos evaluados ( $p = .5\%$ ). Por lo que, aparentemente, no afecta negativamente el continuo descongelamiento y congelamiento de la solución viral (inóculo) usado para la producción del VPN. Contrario a lo que se reporta en la literatura que no es recomendable almacenar por mucho tiempo las partículas virales purificadas y deben ser usadas tan pronto sean preparadas para el passage, en parte por que los procesos de putrefacción y melanización reducen la calidad del producto final como lo señala Hunter, *et al*, 1984. Aunque la solución viral usada no fue purificada, se considera que el efecto de la putrefacción y melanización ocurre de igual manera en las larvas muertas y que el descongelamiento por un período de tiempo permite que estos procesos continúen.

Tabla 4. Análisis de varianza de la mortalidad producida en larvas de *Spodoptera exigua* sometida a diferentes tratamientos de congelamiento y descongelamiento. LCB-CIRCB, 2004.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	94.833	5	18.967	1.456	.253
Intra-grupos	234.500	18	13.028		
Total	329.333	23			

Se observa, sin embargo, una tendencia de una mayor mortalidad, ver gráfica 3, en los tratamientos en donde el inóculo es preparado por 7 días, así como, en el inóculo donde se selecciona el tipo de LE usada (antes de que ocurra el proceso de melanización), que se reportan en la literatura como de mayor calidad (Hunter, *et al*, 1984.). Sin embargo, se sugiere repetir el experimento en otras condiciones para confirmar estos resultados.



Gráfica 3. Promedios de mortalidad en larvas de *Spodoptera exigua* por tratamiento en ensayo de calidad del inóculo. CIRCB. Campus Agropecuario, 2004.

Otro aspecto importante es la contaminación por bacterias, la cual es mayor en el tratamiento donde el proceso de congelamiento y descongelamiento se da por 15 días y en el tratamiento donde se utilizó el inóculo usado normalmente en la producción del laboratorio. Lo que confirma que el continuo descongelamiento permite que bacterias contaminantes patogénicas para vertebrados invaden la solución viral (cadáveres de larvas), disminuyendo la calidad del virus (Burges, 1981), por lo que se recomienda la selección del inóculo para la producción y cosecha de larvas antes del proceso de melanización, que permita que la mortalidad por bacterias contaminantes sea mínima y no afecte la pureza del producto final, además que esté dentro del margen indicado por las regulaciones de registro del producto final, la cual debe ser menor que  $10^7$  bacterias totales/g (Burges, 1981).



Por otro lado, los rendimientos por larva y por tratamiento de Cuerpos de Inclusión Poliedral, no muestran diferencias entre los tratamientos como se observa en la Tabla 4, ya que todos son del orden de  $10^8$  CIP/larva y de  $10^{10}$  CIP/tratamiento. Estos resultados indican nuevamente que los rendimientos están por debajo del estándar internacional. (Alves, 1987).

Tabla 5 Rendimientos en CIP /larva y por tratamiento en ensayo de calidad el inóculo. LCB. CIRCB.2004.

Tratamiento	N° larvas infectadas	N° LE cosechadas	Concentración	
			CIP /LE totales	CIP/larva
1	150	126	$1.59 \times 10^{10}$	$1.26 \times 10^8$
2	150	119	$2.365 \times 10^{10}$	$1.97 \times 10^8$
3	150	136	$2.27 \times 10^{10}$	$1.67 \times 10^8$
4	150	131	$2.12 \times 10^{10}$	$1.62 \times 10^8$
5	150	120	$1.79 \times 10^{10}$	$1.49 \times 10^8$
6	150	132	$2.14 \times 10^{10}$	$1.64 \times 10^8$

### 3. Determinación de la concentración del producto final (CIP/dosis).

Como se observa en la Tabla 6, la concentración del virus por LE producida en el laboratorio es del orden de  $10^8$ , lo que está por debajo del estándar establecido en la literatura para *Baculovirus Heliothis* que es de  $6 \times 10^9$  y para *Anticarsia gemmatalis* es  $1.3 \times 10^9$  CIP, donde una LE es igual a 6 Unidades virales (UV) (Alves, 1986). Por otro lado, se observa sin embargo, una variación menor (del orden de una potencia), que podrían ser significativas en condiciones de campo.

Las variaciones que se muestran en el número de larvas por lote, Tabla 6, obedecen a diferencias en el número de larvas almacenadas por envase. Cuando se preparan las dosis de VPN para comercializar, se utilizan estas larvas que se han almacenado en cantidades diferentes, procediendo a sumar las larvas y se adiciona un volumen de agua.

Esto es debido a que la cosecha de larvas se almacenan en tazas conteniendo números diferentes de LE, las que al momento de preparar las dosis es difícil de separar la mezclar con el agua y filtrar para empacar la formulación líquida o cruda. Por lo que se hace necesario conocer la relación de volumen vs. concentración de CIP que permita la homogenización y estandarización de la producción de manera que cada dosis tenga la concentración adecuada de CIP.

Tabla 6 Concentración en CIP del Se VPN, producido en un período de 5 meses en el 2004. CIRCB. UNAN-León.

Nº Lote	Mes	LE/Lote	CIP/lote	CIP/Larva
1	Julio	191	$3.805 \times 10^{10}$	$1.99 \times 10^8$
2	agosto	154	$2.0875 \times 10^{10}$	$1.355 \times 10^8$
3	septiembre	135	$3.535 \times 10^{10}$	$2.618 \times 10^8$
4	octubre	159	$3.695 \times 10^{10}$	$2.463 \times 10^8$
5	noviembre	148	$3.68 \times 10^{10}$	$2.48 \times 10^8$
	Promedio		<b><math>3.3605 \times 10^{10}</math></b>	<b><math>2.18 \times 10^8</math></b>

En la Tabla 7 se muestra otro grupo de larvas, donde de manera individual se realizó el conteo de CIP, indicando una concentración de  $10^9$ , esto indica la variabilidad existente en la producción de larvas.

Tabla 7. Concentración de cuerpo de inclusión poliedral por larva, en larvas de *Spodoptera exigua*, en el laboratorio de virus de la UNAN-León.

No de larvas	Peso de larvas muertas	Rendimientos (CIP/larva)
1	0.23	$2.475 \times 10^9$
2	0.34	$8.75 \times 10^9$
3	0.33	$7.5 \times 10^9$
4	0.19	$3.825 \times 10^9$
5	0.23	$3.425 \times 10^9$
6	0.15	$2.3 \times 10^9$
1*		$3 \times 10^9$
2*		$3.95 \times 10^9$
3*		$2.5 \times 10^9$

\* Peso no disponible

## VII. CONCLUSIONES

El continuo congelamiento y descongelamiento de la solución viral no afecta negativamente el inóculo usado para la producción, pero sí contribuye a incrementar la contaminación de la solución viral por bacterias y hongos patógenos contaminantes.

La cepa de VPNSe producida en el Laboratorio mantiene la misma patogenicidad y virulencia.

Los rendimientos encontrados de CIP/Larva están por debajo del estándar internacional siendo estos del orden de  $10^7$  y  $10^8$  CIP/Larva.

## **VIII. RECOMENDACIONES**

Al momento de infectar las larvas se debe de tener en cuenta la edad de la larvas para que al cosechar larvas muertas por virus sean grandes y uniformes y así poder obtener una concentración adecuada del inóculo.

Realizar estudios que permitan demostrar la concentración de CIP de las larvas pequeñas y la relación con una LE

Determinar los contaminantes que afectan la calidad de la producción de VPN.

Construir un laboratorio de control de calidad que permita todas las condiciones necesarias y evitar la contaminación por bacterias u otros agentes lo que permitirá un mayor grado de confiabilidad en los datos.

Las larvas cosechadas deben de ser almacenadas en frascos individuales con la cantidad de larvas que forman una dosis de virus, permitiendo así el ahorro de larvas.

## IX. BIBLIOGRAFIA

1. Alves B. Sergio *et al*, 1986. Controle Microbiano de Insectos. Editora LTDA. -Sao Paulo (Brasil).
2. Behle R. y Tamez Guerra P., 2003. Procesos Biotecnológico. Universidad Nacional de Nuevo León.
3. Burges, 1981. Progress in the Microbial Control of Pests, 1970-80. *In* Microbial Control of pest and plant diseases. 1970-1980. Academic Press. 1981. 1-6p.
4. Couch T. L., and Ignoffo, 1981. Formulation of Insect Pathogens. *In* Microbial Control of pest and plant diseases. 1970-1980. Burges Ed., Academic Press. 621-634p.
5. Hunter F. R *et al*, 1984. Virus as Patogens for the Control of Insects. Review of Society for Applied Bacteriology. 323-346p
6. Ibarra y León, 1988, Cuantificación Toxicológica de *Bacillus Thuringiensis*, bajo control de laboratorio. Centro de investigación y estudios avanzados del I.P.N., Unidad Irapuato.
7. Ignoffo and T.L Couch, 1981. The Nucleopolyhedrosis Virus of *Heliothis Species* as a Microbial Insecticide. *In* Microbial Control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press. 1981. 330-362p.
8. Lecuona R. E, 1996. Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plagas. Ed Talleres Gráficos Marinao Mas. Argentina. 338p.
9. Moscardi, F., 1983. Utilizacao de *Baculovirus anticarsia*, para o controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*. EMBRAPA DE SOJA. No. 23, 21p

10. Moscardi, F. 1986. Utilizacao de virus para o controle da lagarta –da-soja. *In* Controle Microbiano de Insectos. Editora LTDA. -Sao Paulo (Brasil).
11. Payne and Kelly, 1981. Identification of Insect and Mite Viruses. In Microbial Control of pest and plant diseases. 1970-1980. Burges Ed. Academic Press. 93-106p.
12. Rizo C., et al. 1992. Informe final del área de Virus de Insectos. Departamento de Control Integrado de Plagas. UNAN-León.
13. Smits P.H, 1987. Nuclear Polyedrosis Virus as Biological Control Agent of *Spodoptera exigua*.

