
NORMA CUBANA

NC

732: 2012

BIOLARVICIDA GRISELESF—ESPECIFICACIONES

Biolarvicide GRISELESF—Specifications

ICS: 07.080; 91.100.99

**1. Edición Diciembre 2012
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA**

**Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 El Vedado, La Habana. Cuba.
Teléfono: 830-0835 Fax: (537) 836-8048; Correo electrónico: nc@ncnorma.cu; Sitio
Web: www.nc.cubaindustria.cu**



Cuban National Bureau of Standards

NC 732: 2012

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC) es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba y representa al país ante las organizaciones internacionales y regionales de normalización.

La elaboración de las Normas Cubanas y otros documentos normativos relacionados se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. Su aprobación es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en las evidencias del consenso.

Esta Norma Cubana:

- Ha sido elaborada por el Comité Técnico de Normalización NC/CTN 97 de Sanidad Vegetal integrado por representantes de las siguientes entidades:
 - Grupo Empresarial de Producciones Biofarmacéuticas y Químicas (LABIOFAM)
 - Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV)
 - Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV)
 - Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT)
 - Centro de Ingeniería e Investigaciones Químicas (CI IQ)
 - Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA)
 - Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal (LAPROSAV) en La Habana
 - Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT)
 - Instituto Nacional de Higiene y Epidemiología (INHEM)

- Se elaboró tomando en cuenta los elementos aplicables del documento “*Lineamientos de producción de Bacillus thuringiensis H-14 y Bacillus sphaericus*” 1990, OMS

© NC, 2012

Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada en alguna forma o por medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias, fotografías y microfilmes, sin el permiso escrito previo de:

Oficina Nacional de Normalización (NC)

Calle E No. 261, El Vedado, La Habana, Habana 4, Cuba.

Impreso en Cuba.

0 Introducción

0.1 El control biológico está basado en el uso de organismos capaces de provocar patologías en objetos blancos, vectores de agentes causales de enfermedades, representando gran especificidad, inocuidad y seguridad medio-ambiental.

0.2 Entre las bacterias más usadas para el control biológico de los mosquitos se encuentran las productoras de esporas y cristales endotóxicos, como es el *Bacillus sphaericus* 2362, efectivo en el control de larvas de mosquitos de los géneros: *Anopheles*, *Culex*, *Mansonia*, *Psorophora*, *Uranotaenia* que son vectores de importantes enfermedades como la Malaria, la Filariasis, la Encefalitis, entre otras.

0.3 En Cuba, varios investigadores de la Academia de Ciencias, del Instituto de Higiene y Epidemiología y del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK) desarrollaron la tecnología para la producción local de la formulación con el nombre comercial GRISELESF, con materias primas nacionales. Estas investigaciones tuvieron soporte financiero por la Organización Mundial de la Salud (OMS) e hizo acreedor al Departamento de Control de Vectores del IPK, centro de referencia de la Organización Panamericana de la Salud/OMS.

0.4 El uso operacional de este producto ha sido intensivo en América Latina, Asia y África, con resultados satisfactorios, llevando a cabo la reducción de la incidencia de la Malaria, la Filariasis entre otras enfermedades.

0.5 Existen experiencias nacionales e internacionales de la efectividad de este producto en diferentes tipos de criaderos, así como la inocuidad del mismo con respecto a la flora y la fauna acompañante.

BIOLARVICIDA GRISELESF—ESPECIFICACIONES**1 Objeto**

Esta norma establece los requisitos de calidad del biopreparado entomopatígeno obtenido a partir de *Bacillus sphaericus* cepa 2362 mediante fermentación aerobia.

2 Referencias normativas

Los documentos que se mencionan seguidamente, son indispensables para la aplicación de esta Norma Cubana. Para las referencias fechadas, solo se toma en consideración la edición citada. Para las no fechadas, se toma en cuenta la última edición del documento de referencia (incluyendo todas las enmiendas).

- NC 796: 2010 Agricultura — Sanidad Vegetal — Términos y definiciones
- NC 798: 2010 Plaguicidas — Método de muestreo

3 Términos y definiciones

A los fines de este documento, se aplican los términos y definiciones establecidos en la NC 796, así como los siguientes:

3.1 bioplaguicida

organismos biológicos (Bacterias, Virus, Hongos) y vertebrados e invertebrados utilizados para el control de plagas.

3.2 entomopatígeno

patógenos específicos para los insectos.

3.3 esporas

estadio morfológico de algunos grupos de bacterias que se caracterizan por resultar más resistentes que las formas vegetativas.

3.4 cristales

toxina con estructura cristalina característica de la especie *Bacillus sphaericus* cuya formación está asociada al estadio morfológico de esporas.

3.5 contaminación

presencia de microorganismos no deseados que pueden aparecer durante el proceso de manufactura de un biopreparado.

3.6 cepa

organismo inicial de una población, obtenida a partir de un ancestro único. Todos sus descendientes poseen las características de la especie.

3.7 lote

cantidad definida de un determinado producto, elaborado en condiciones que se presuponen uniformes.

3.8 muestra ensayo

muestra conformada con alícuotas de diferentes frascos del bioplaguicida a analizar.

3.9 muestra testigo

muestra final debidamente sellada que se conserva para comprobación en caso de discrepancias.

4 Símbolos y abreviaturas

CL₅₀ – Concentración Letal Media
 UFC – Unidades Formadoras de Colonias
 mL – mililitros
 ppm – Partes por millón
 U.T.I – Unidades Tóxicas Internacionales

5 Requisitos**5.1 Requisitos de higiene**

Se cumplirán los requisitos de las Buenas Prácticas de Laboratorio, Buenas Prácticas de Producción, y de Bioseguridad.

5.2 Requisitos de calidad de las materias primas

5.2.1 Requisitos del medio de cultivo: El medio que se utilice reunirá todos los nutrientes requeridos para el crecimiento del microorganismo y debe ser estéril.

5.2.2 Requisitos de la cepa de *Bacillus sphaericus* 2362

En la Tabla 1 se establecen los requisitos de la cepa.

Tabla 1 — Requisitos de la cepa

Denominación	Pureza	Título de esporas (esporas/mL)	Eficacia (%)	Viabilidad (UFC/mL)
Cepa	Pura	$\geq 10^8$	100 %	$\geq 10^8$

5.3 Requisitos de calidad del biolarvicida GRISELESF

En la Tabla 2 se establecen los requisitos de calidad para el biolarvicida GRISELESF.

Tabla 2 — Requisitos de calidad del biolarvicida GRISELESF

Requisito	Parámetros
Pureza microbiológica	Presencia de la bacteria <i>Bacillus sphaericus</i> cepa 2362 $\leq 10^3$ bacterias/mL de microorganismos no patógenos.

Inocuidad	Inocuo
Potencia biológica	No menor de 268 UTI/mg Bioensayo de eficacia: ≥ 80 % de mortalidad en 0,8 ppm, a las 48 horas.
pH (final)	7 - 8,5
Título de esporas (esporas/mL)	$\geq 10^8$ esporas/ mL.
Características organolépticas	Apariencia: Suspensión acuosa, que se homogeniza fácilmente, sin cuerpos extraños. Color: Carmelita con intensidad variable Olor: Característico

5.4 Requisitos de aplicación

El biolarvicida GRISELESF está recomendado para el uso en criaderos de larvas de mosquitos de diferentes características bio-ecológicas. No es compatible con pH altamente alcalino, mayores que 8,5. No debe utilizarse junto con el ABATE, porque se inactiva.

Se aplicará tomando en consideración el área efectiva del criadero (espacios con presencia de larvas). No se tomará en consideración el volumen del agua ni la profundidad.

Las aplicaciones se realizarán por aspersión de la superficie acuática de los criaderos por vía terrestre, menores a una hectárea, la dosis a utilizar es de 5 mL/m²-10 mL/ m². En criaderos mayores de 1 ha se utilizará aplicación aérea (aviones con sistemas de boquillas Tee Yet y en helicópteros) en dosis de 50 L/ha a 100 L/ha usando la dosis máxima en criaderos con abundante vegetación. Para obtener óptimos resultados se debe tomar en consideración la época del año, empleándose con posterioridad a los períodos lluviosos y ante la aparición masiva de larvas de primer y tercer estadios. No se recomienda su uso en el cuarto estadio avanzado o en pupas.

6 Muestreo

6.1 Método de inspección (Inspección de aceptación)

La presencia de olores extraños indica la existencia de contaminación aguda del biopreparado.

Para la determinación de los requisitos de calidad se realizará la inspección por muestreo de la manera que aparece en el acápite siguiente.

6.2 Plan de muestreo

- Selección de las unidades para el laboratorio:

Las unidades a muestrear de biolarvicida GRISELESF serán seleccionadas según la cantidad de envases de que está compuesto el lote. El muestreo se regirá por la NC 798.

Se hace necesario separar y conservar la muestra testigo para comprobación en caso de discrepancias.

6.3 Procedimiento para la toma y preparación de la muestra de ensayo

Las muestras deben ser tomadas siguiendo las medidas asépticas correspondientes de forma tal que no se alteren los resultados.

7 Métodos de ensayo

7.1 Pureza microbiológica

Esta prueba se establece para determinar la ausencia en las muestras ensayadas de cualquier microorganismo que no sea el que constituye el producto, mediante observación microscópica y al emplear medios de cultivos comunes y diferenciales para la determinación de bacterias, hongos y levaduras, así como, comprobar si cumplen con los límites microbianos establecidos en los documentos técnicos.

Esta incluye:

- Observación de las características típicas de la cepa *B. sphaericus* 2362 al microscopio óptico (1000X) a través de la tinción de Gram (bacilos Gram variables).
- Determinación del nivel de contaminantes.
- Utilización de medios de cultivo comunes (Medio Tioglicolato, Caldo Triptona Soya, Base de Agar Sangre y Agar Triptona Soya) y medios de cultivo diferenciales para la determinación de microorganismos patógenos (Tabla 3).

Tabla 3 — Medios de cultivo diferenciales para la determinación de microorganismos patógenos

Microorganismo	Medio de cultivo
<i>Pseudomonas sp.</i>	Agar Cetrinida
<i>Staphylococcus sp.</i>	Agar Manitol Salado Base de Agar Baird-Parker
<i>Streptococcus sp.</i>	Agar Slanetz y Bartley
<i>Salmonella sp.</i>	Agar Verde Brillante Agar SS
<i>Escherichia coli</i>	Agar de MacConkey Endo Agar
<i>Clostridium sp.</i>	Agar Sulfato de Hierro
Hongos	Agar Dextrosa de Sabouraud

7.2 Inocuidad inespecífica

Este método se establece para determinar si el biopreparado es inocuo. Para ello se inocula por vía intraperitoneal una solución de concentración de 10^6 esporas/mL en ratones albinos con peso de 18 g a 20 g.

7.3 Pruebas biológicas

7.3.1 Bioensayo de eficacia del producto GRISELESF

El objetivo es determinar la eficacia sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* de III estadio e inicio de IV estadio, talla 4 mm. El por ciento de mortalidad a las 48 h se anota en la Tabla 4.

Tabla 4 — % de Mortalidad (48 h)

Concentración (ppm)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4
1,00				
0,80				
0,64				
0,51				
0,40				
Control				

Criterio de análisis: La mortalidad debe ser superior al 80% en la concentración de 0,8 ppm a las 48 horas.

El bioensayo se desecha cuando el % de mortalidad del control es superior al 20 %. Cuando la mortalidad del control es menor o igual al 5 % se corrige a través de la siguiente fórmula:

$$Abbott = \frac{\% Mortalidad (exp erimento) - \% Mortalidad (control)}{100 - \% Mortalidad (control)}$$

Cuando el producto no cumpla con los parámetros de actividad biológica establecidos, se considerará no apto para comercializar.

7.3.2 Determinación de la Potencia Biológica y la CL₅₀

Potencia Biológica: Las Unidades Tóxicas Internacionales (U.T.I.) se relacionan con un estándar de *B. sphaericus* internacional de 1 700 U.T. I./mg, SPH 88.

La misma se calcula a través de la siguiente fórmula:

$$UTI / mg (Pr oducto) = \frac{UTI / mg (Sandard) x CL 50 (Sandard)}{CL 50 (Pr oducto)}$$

Determinación de la CL₅₀: Mediante análisis Probit que utiliza la mortalidad transformada a su correspondiente valor Probit contra el logaritmo (base 10) de la concentración de *B. Sphaericus* 2362 (como variable independiente) para efectuar el análisis de regresión y obtener las concentraciones letales medias con sus límites de confianza (95%) respectivos.

Los valores de la Potencia Biológica y la CL₅₀ se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5 — Potencia Biológica y CL₅₀

Parámetros	Especie blanco: <i>Culex quinquefasciatus</i>	
	Standard SPH-88	GRISELESF
CL ₅₀	0,06	0,38
UTI/mg	1700	268

Criterio de análisis: El formulado GRISELESF debe contener no menos de 268 UTI/mg.

8 Marcado, etiquetado, envase y/o embalaje

8.1 Marcado y etiquetado

Las muestras deben estar correctamente identificadas para lo cual deben llevar etiquetas con los siguientes datos:

- Nombre completo del producto: GRISELESF.
- Tipo de formulación: Suspensión acuosa.
- Composición: Esporas y cristales de *Bacillus sphaericus* cepa 2362 0,5 %
Ingredientes inertes 99,5 %
- Instrucciones y advertencias de uso: Para el control de larvas de mosquitos (de I a inicio de IV estadio) de los géneros *Anopheles*, *Culex*, *Psorophora*, *Mansonia*, *Uranotaenia* y algunas especies de *Aedes*.
- Modo de acción: Por ingestión, causando parálisis intestinal.
- Protección de la salud humana y del ambiente: Inocuo para humanos, animales y plantas. Biodegradable.
- Almacenamiento: Consérvese en lugar fresco, seco y sombreado a temperaturas de 4 hasta 30 °C. Manténgase el envase cerrado después de su uso. Bajo estas condiciones es estable hasta 2 años.
- Nombre y dirección del fabricante: Ave. Independencia km 16 ½. Stgo de las Vegas, Boyeros. La Habana. Cuba.
- Lote, Fecha de Fabricación y Fecha de vencimiento: Según los datos del lote.
- Presentación: 1, 5, 20 L.

8.2 Envasado

8.2.1 Envase para el biolarvicida GRISELESF

El producto será envasado en tanques plásticos, previamente esterilizados. Una vez terminado el envase, los tanques se trasladan a un almacén limpio, seco, ventilado y protegido de las radiaciones solares conservándose a temperaturas entre 4 y 30 °C.

El producto puede ser envasado en diferentes presentaciones como son: 1, 5 y 20 Litros.

8.2.2 Descripción de los envases

El envase será plástico de diferentes tipos: polietileno de alta densidad u otros, con tapas de cierre hermético.

9 Transportación, manipulación, almacenamiento y conservación

9.1 Transportación y manipulación

El envase debe ser hermético, a fin de evitar derrames o contaminaciones del biolarvicida durante su traslado.

El producto se transportará en un vehículo seguro, limpio, ventilado, separado de otros productos que puedan contaminarlo y protegido de las radiaciones solares. Podrá ser transportado por vía terrestre, aérea, marítima o fluvial.

9.2 Almacenamiento y conservación

Se debe almacenar en lugares limpios, ventilados, secos y protegido de las radiaciones solares, a temperaturas de 4 hasta 30 °C. Estable por 2 años.

Bibliografía

- [1] U. S. P. 26. 2003. Ensayo Límite Microbiano. pág. 2006.
- [2] Grupo Empresarial LABIOFAM. Tecnología de Producción de GRISELESF[®], 2003.
- [3] Bacteries Entomopathogenes. Institut Pasteur. 24 fev 98 10:56 Bact Entomopath. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* 1990.
- [4] Montero G, et al. “Resultados de las aplicaciones en pilotaje del biolarvicida *Bacillus sphaericus* 2362 en criaderos de mosquitos del Mun. Sta Cruz del Norte”. Rev. Cub. Med. Trop. 43 (1): 39–44, 1991.
- [5] Montero G, et al. “Efectividad de una formulación líquida de *B. sphaericus* 2362 (GRISELESF) para el control de mosquitos en campos de arroz”. SICCNBIOL, BRASIL, 1992.
- [6] Montero G, et al. “Permanencia de la actividad larvicida del B.s cepas 2362 y 2297 en *Culex quinquefasciatus*”. Rev. Kasmaeva–Venezuela 23 (2): 89–190, 1993.
- [7] Montero G, et al. “Producción local en pilotaje de BS 2362 y BtH–14 en la Rep. de Cuba”. Proyecto OMS. No. 840269, 1987–1991.
- [8] Blanco S. “Impacto del uso del larvicida GRISELESF para el control de vectores maláricos en el Dpto. de Escuintla (Guatemala)”. Rev. Med. Trop. (en prensa).