

# ***Un análisis cuantitativo de un método de alimentación modificado para la cría de *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae) en el laboratorio***

**Eva Chin-Heady,<sup>a</sup> Joseph J DeMark,<sup>b</sup> Steve Nolting,<sup>a</sup> Gary Bennett,<sup>c</sup> Kurt Saltzmann<sup>d</sup> and Ronda L Hamm<sup>a\*</sup>**

## **Resumen**

**ANTECEDENTES:** Se desarrolló un sistema de alimentación artificial modificado para la cría de *Cimex lectularius* y se comparó con el método de alimentación artificial más utilizado que requiere cristalería hecha a medida y un baño de agua en circulación para calentar la sangre. El método de la placa de Petri reduce algunos de los inconvenientes del método de baño de agua corriente, tales como la posibilidad de inundación de los frascos de crianza de chinches con agua o sangre y la necesidad de costosos artículos de vidrio a medida.

**RESULTADOS:** A las ninfas de primer estadio de cepas de campo y de laboratorio se les dio un intervalo de 15 ó 30 minutos para alimentarse por 6 – 9 semanas. El análisis de las chinches que se alimentaron durante un período de tiempo de 6 semanas mostró que no había diferencia significativa en los números que se alimentaron usando el método de la placa de Petri en comparación con aquellos que se alimentaron mediante el método del baño de agua. El desarrollo de las ninfas también mostró que no había diferencia significativa en el tiempo requerido para producir adultos por cualquiera de los métodos.

**CONCLUSIÓN:** El método de la placa de Petri es una alternativa atractiva ante el método de baño de agua. La configuración es menos compleja, más rápida, se pueden alimentar múltiples frascos de chinches de la cama al mismo tiempo, las placas de Petri de sangre son desechables para facilitar la limpieza y reducen la mortalidad potencial debido a las inundaciones con la sangre o el agua.

**Palabras clave:** técnica de alimentación artificial; cría de chinches de cama; método de la placa de Petri; sistema de alimentación de membrana

## **1 INTRODUCCIÓN**

Desde la década de 1950 hasta finales de 1990, las chinches de cama, *Cimex lectularius* L. (Hemiptera: Cimicidae) eran una plaga relativamente rara en Estados Unidos y otros países desarrollados<sup>1, 2</sup> La menor importancia de las chinches como plaga doméstica durante este período se tradujo en el abandono de la investigación centrado en las chinches. Con el reciente resurgimiento y la rápida propagación de las chinches en Estados Unidos y otros países desarrollados,<sup>3</sup> se ha vuelto importante criar y estudiar este insecto. Su única fuente de alimentación conocida es la sangre, y se requiere una comida de sangre para que las ninfas muden a otro estadio.<sup>4</sup> Con alimentación regular y apareamiento, las hembras adultas pueden producir 5 – 7 huevos por semana y 200 -500 huevos en una alimentación regular de por vida.<sup>5</sup> También es importante porque los machos bien alimentados tienen mayor éxito en el apareamiento con las hembras, que son menos resistentes a los intentos de apareamiento.<sup>6</sup>

\* Correspondence to: Ronda L Hamm, Dow AgroSciences LLC, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268, USA. E-mail: rlhamm@dow.com

<sup>a</sup> Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, IN, USA

<sup>b</sup> Dow AgroSciences LLC, Fayetteville, AR, USA

<sup>c</sup> Department of Entomology, Purdue University, West Lafayette, IN, USA

<sup>d</sup> 1920 East 10th Street, Anderson, IN 46012, USA

Pest Manag Sci (2013)

www.soci.org

© 2013 Society of Chemical Industry

Las chinches criadas en el laboratorio se mantienen mediante una técnica de alimentación artificial, con animales vivos, como pollos o voluntarios humanos. La cría artificial de chinches ha demostrado ser difícil. Takano-Lee et al.<sup>7</sup> utilizaron un aparato de alimentación automática con éxito para los piojos humanos, *Pediculus capitis* DeGeer., Sin embargo, las chinches alimentadas por este aparato no pusieron huevos viables. Montes y cols desarrollaron un sistema de alimentación artificial para chinches de la cama<sup>8</sup> que requiere el uso de material de vidrio especializado, un baño de agua circulante y una membrana tal como parafina. La cristalería especializada está diseñada para trabajar en conjunto con el baño de agua en circulación para calentar y mantener la sangre a temperatura constante. Tiras de papel dentro de frascos de boca ancha cubiertos de malla permiten a las chinches de la cama subir a la membrana para alimentarse. Aunque este sistema artificial es ampliamente utilizado, no está libre de inconvenientes.

Estos inconvenientes incluyen material de vidrio caro hecho a medida y baño de agua circulante, el riesgo de fuga de agua si la manguera del baño debe aflojarse o el problema más común de la sangre goteando y acumulándose en los frascos donde se encuentran las chinches. Las fugas pueden ocurrir si la parafina se debilita por el calor o por la penetración repetida por las piezas bucales de las chinches. Las fugas son perjudiciales, pues las chinches pueden llegar a ser atrapadas y asfixiarse en la sangre coagulada. Para la alimentación se necesita un buen contacto entre el papel, la pantalla y la parafina, pero pueden ocurrir lagunas. El papel puede cambiar debido al peso y el movimiento de las chinches de la cama, o se puede deformar con el tiempo como resultado de la acumulación de humedad. Además, si se tuerce la pantalla se crea un área donde las chinches no son capaces de ponerse en contacto con la sangre. Aunque *C. lectularius* prefiere alimentarse de sangre humana, puede sobrevivir alimentándose de otros animales, como aves, murciélagos, ratones y conejos.<sup>9, 10</sup> Usinger<sup>9</sup> encontró que *C. lectularius* criadas en conejos tuvieron mayor fecundidad en comparación con las criadas en pollos, seres humanos y palomas. Las chinches adultas machos y ninfas se alimentan de la sangre a temperaturas que van desde 34 hasta 42 ° C; sin embargo, se encontró que la temperatura óptima de alimentación para las hembras era de 37 -38 ° C.<sup>11</sup>

Se desarrolló un novedoso sistema artificial de alimentación utilizando placas de Petri y una placa caliente, en este documento referido como el método de placa de Petri, y se comparó con el sistema actualmente disponible de alimentación artificial en el que se utiliza un baño de agua, al que se hace referencia aquí como el método de baño de agua. Se alimentaron ninfas de primer estadio exclusivamente una vez por semana usando el baño de agua o el método de placa de Petri.

La comparación de los dos métodos se basa en el número de chinches que se alimentaron y sobrevivieron y el número de adultos producidos.

## 2 MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Colonias de chinches de cama

Se recogió una cepa de campo de chinches de cama de un rascacielos, un complejo de apartamentos de bajos ingresos en Indianápolis, Indiana, mientras que se obtuvo una cepa de laboratorio de chinches de la Universidad de Florida en Gainesville. Se mantuvo a las chinches en frascos claros de plástico de boca ancha de 2 oz, (Consolidated Plastics Company, Inc., Stow, OH).

Se retiraron los fondos de los recipientes y se pegaron las pantallas de organza (Jo-Ann Fabric & ArtStore, Hudson, OH) en su lugar con goma caliente. Se alimentó a las chinches una vez a la semana con sangre de conejo que contenía citrato de sodio al 2%, un anticoagulante (Hema-Resource & Supply, Inc., Aurora, OR). Bell y Schaefer<sup>11</sup> señalaron que la sangre de conejo almacenada demasiado tiempo se convertía en tóxica para las chinches de la cama, y recomendó que la sangre se utilice no más de 4 días después de ser extraída. En base a esto, se almacenó la sangre de conejo recibida cada semana para alimentar a las chinches de cama a 3 ° C y se utilizó dentro de los 4 días de recibida. Se colocó un disco de papel de filtro Whatman No. 1 (55 cm) (Whatman, Inc., Piscataway, NJ) perpendicular a la parte inferior de cada frasco para proporcionar una superficie para que las chinches pudieran caminar y depositar sus huevos. Las colonias de chinches se mantuvieron en una cámara ambiental Conviron (Conviron, Winnipeg, Manitoba) a 26 ° C y 60% de humedad relativa con un fotoperíodo de 13:11 h luz: oscuridad.

### 2.2 Método de alimentación por baño de agua

Montes et al.<sup>8</sup> proporcionaron una descripción detallada del método de baño de agua. En resumen, se unieron cuatro aparatos de alimentación cristalería (Kimble / Kontes, Lombard, IL) a un baño de agua con tubos de látex (Fisher Científico, Pittsburgh, PA), y se extendió una pieza de 25 x 20 mm de membrana Parafilm "M" (Pechiney Plastic Packaging Company, Chicago, IL) a través de la parte inferior de la cristalería. En el centro hueco de la cristalería se colocó una cantidad de 5 ml de sangre de conejo que contenía citrato de sodio 2% (Hema-Recursos & Supply, Inc., Aurora, O) y se agrupó en el Parafilm. La parafina proporciona una barrera para que las chinches se alimenten a su través. El baño de agua se ajustó a circular y calentar la sangre a 37 ° C. Se midió la temperatura de la parafina con un termómetro de infrarrojos (Equipo Profesional, Janesville, WI), y la temperatura del baño de agua se ajusta según sea necesario para mantener una temperatura óptima de alimentación.

### 2.3 Método de alimentación con placa de Petri

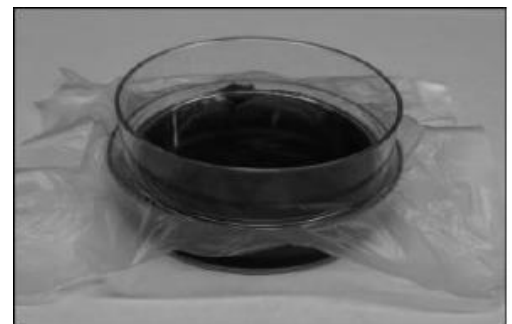


Figura 1. Una tapa de placa de petri que contiene 5 ml de sangre de conejo y cubierta con una membrana de Parafilm estirada. La parte inferior de la placa de Petri (en la parte superior en la foto) se utiliza para empujar el Parafilm hacia abajo para hacer contacto con la sangre.

Se colocó una cantidad de 5 ml de sangre de conejo conteniendo 2% de citrato de sodio en la tapa invertida de un 60 × 15 mm de placa de Petri de plástico (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Membrana Parafilm se estiró y colocó a través de la tapa, mientras que la parte inferior de la placa de Petri se usó con cuidado para empujar el Parafilm hacia abajo y asegurar un buen contacto entre la parafina y la sangre (Fig. 1) y luego se retiró. Después, se envolvió el exceso de parafina alrededor del lado de la tapa invertida. Las placas de Petri preparadas (Fig. 2) se colocaron después en una placa caliente Barnstead / Thermolyne Super-Nuova digital (Fisher Científico, Pittsburgh, PA). La placa caliente se estableció para calentar la sangre a 37 ° C. De forma similar al método de baño de agua, la temperatura de la parafina se controló periódicamente usando un termómetro infrarrojo y se ajustó según sea necesario para mantener la temperatura de alimentación de 37°C.

#### 2.4 Prueba de alimentación

Se realizaron tres ensayos, dos de ellos con la cepa de laboratorio y el otro con la cepa de campo. Las ninfas utilizadas para cada ensayo se obtuvieron mediante la colocación de aproximadamente 50 hembras adultas alimentadas y apareadas en los frascos que contenían un disco de papel de filtro Whatman N ° 1 de 55 cm. Después de 3 a 5 días, los adultos fueron retirados y se colocó el papel de filtro que contenía los huevos en una cámara climática a 26 ° C y 60% de humedad relativa con un fotoperíodo de 13:11 h luz: oscuridad. Después de 1 semana, se recogieron las ninfas no alimentadas eclosionadas y se utilizaron para el bioensayo. Los bioensayos se realizaron utilizando 8 -10 repeticiones, con diez ninfas de chinches de cama por repetición. Las ninfas se colocaron en frascos de boca ancha de 2 oz con un tamiz de fondo. Para facilitar el movimiento de chinches entre la tapa y la pantalla y minimizar el daño a las ninfas, se colocó una



Figura 2. Caja de Petri preparada con sangre de conejo y frasco de alimentación con papel de filtro en bucle.

tira de papel de filtro de 14 × 2 mm (Whatman, Inc.) en un bucle haciendo una rendija de 1 mm cerca de cada extremo de la tira de papel de filtro y uniendo las hendiduras opuestas. En cada recipiente se colocó un bucle de papel de filtro (fig. 2). En el primer intento se les permitió a las chinches alimentarse por 15 minutos. El tiempo de alimentación se incrementó a 30 min en los ensayos posteriores, y los contenedores se rotaron después de los primeros 15 min para minimizar la variación en la temperatura de la parafina, que varió desde 37 hasta 40 ° C, dependiendo de la ubicación del material de vidrio o placa de Petri. Para ayudar a aumentar la actividad de las chinches, se invirtieron las tiras de papel después de 15 min para proporcionarle la oportunidad de alimentarse a las ninfas escondidas en la parte inferior del papel. Los frascos se colocaron para optimizar el contacto entre la pantalla de organza y el Parafilm, independientemente del método de alimentación. Se ajustaron o reemplazaron las tiras de papel de filtro según era necesario si perdieron el contacto con la pantalla. A las chinches se les dio la oportunidad de alimentar a una vez por semana durante 6 – 9 semanas. Los insectos se mantuvieron a una temperatura constante de 26 ° C y 60% de humedad relativa con un fotoperíodo de 13:11 h luz: oscuridad, excepto durante la alimentación, que se llevó a cabo en el laboratorio a 22 -25 ° C. Se utilizó un total de 520 ninfas: 260 ninfas alimentadas exclusivamente por el método de baño de agua y 260 alimentadas exclusivamente por el método de placa de Petri. La recolección de datos se produjo cada vez que se retiraron los insectos desde el aparato de alimentación. Las observaciones consistieron en contar el número de alimentados (basados en el color y el tamaño del abdomen), los recuentos de individuos vivos y el número de adultos producidos.

#### 2.5 Análisis estadístico

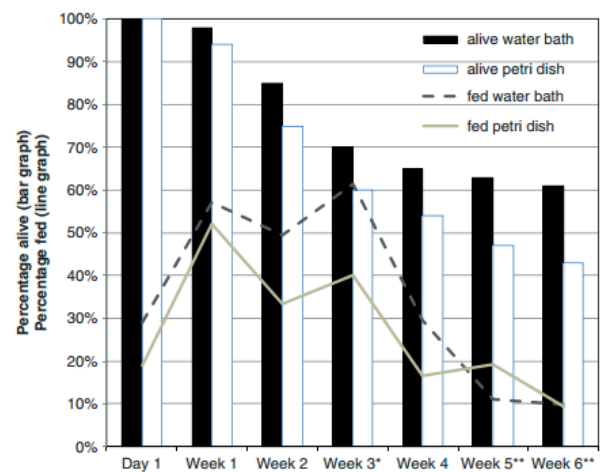


Figura 3. Porcentaje de cepa de chinches de laboratorio que se alimentan y que estaban vivas (n = 100) después de la oferta semanal de una comida de sangre de 15 min. \* El porcentaje alimentado fue significativamente diferente ( $P \leq 0.05$ ); \*\* El porcentaje vivo fue significativamente diferente ( $P \leq 0.05$ ).

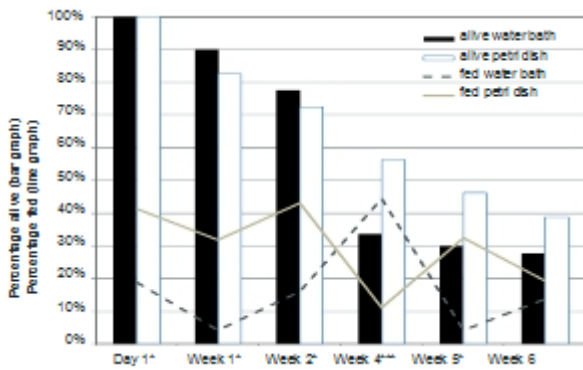


Figura 4. Porcentaje de cepa de chinchas de laboratorio que se alimentaron y que estaban vivas ( $n = 80$ ) después de la oferta semanal de una comida de sangre. \* El porcentaje alimentado fue significativamente diferente ( $P \leq 0,05$ ); \*\*\* El porcentaje alimentado y vivo fue significativamente diferente ( $P \leq 0,05$ ).

Se analizó indiv

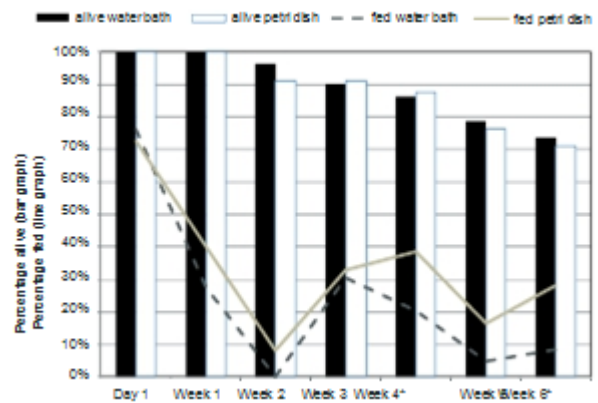


Figura 5. Porcentaje de chinchas de la cepa de campo que se alimentaron y que estaban vivas ( $n = 80$ ) después de la oferta semanal de una comida de sangre de 30 min. \* El porcentaje alimentado fue significativamente diferente ( $P \leq 0,05$ ).

idualmente el número de insectos que se alimentaron, el número vivo y el número de adultos producidos por los dos métodos en cada una de las alimentaciones semanales para cada uno de los tres ensayos. Además, se combinaron los datos de los dos ensayos con períodos de alimentación de 30min y se realizaron los análisis de los datos colectivos. Se obtuvieron evaluaciones acumulativas de alimentación y el número de días con vida de 1 a 6 semanas utilizando una técnica de área-bajo-la-curva reportada por Shaner y Finney.<sup>12</sup> La proporción que se alimentó cada semana y el número vivo fueron las observaciones utilizadas en los cálculos del área-bajo-la-curva y se analizaron mediante técnicas de análisis de varianza.<sup>13</sup> Se utilizaron modelos lineales generalizados que emplean un enlace función logarítmica<sup>13</sup> para analizar los datos obtenidos del binomio alimentado cada semana y los datos de vivos para cada población.

Se realizaron análisis adicionales en los conjuntos de datos combinados de las dos poblaciones alimentadas durante 30 min. Se utilizaron modelos mixtos lineales generalizados con una función de enlace logit para analizar los datos de comida y vivos en las dos poblaciones. La población, la interacción entre la población y los tratamientos y las repeticiones anidadas dentro de una población eran los factores aleatorios. A partir del modelo se eliminaron los efectos aleatorios no significativos determinados a través de diferencias en probabilidades de registro <sup>-2</sup> en comparación con una distribución chi-cuadrado. Las observaciones recogidas por tiempo para adultos se analizaron usando la fiabilidad y la plataforma de análisis de supervivencia en JMP Pro 9.0.1.13

Se realizó una prueba de rango log y una prueba de Wilcoxon para determinar si los tiempos para adultos fueron similares entre la placa de Petri y los grupos de baño de agua. Este estudio no fue diseñado para medir el número de adultos producidos en total, así que no se proporcionan estadísticas en relación con el número de adultos producidos. Se usó un nivel alfa de 0,05 como indicación de importancia en todos los análisis para este estudio, para el que no se indicaron los valores-P.

### 3 Resultados

#### 3.1 Cepa de laboratorio de chinchas alimentadas durante 15 min

En la figura 3 se presenta el número de chinchas que se alimentaron y estaban vivas cada semana usando la placa de Petri o el método de alimentación del baño de agua. En 3 semanas, la proporción de la cepa de laboratorio de chinchas que se alimentaron utilizando el método de baño de agua fue significativamente mayor que utilizando el método de placa de Petri ( $P = 0,03$ ). Sin embargo, el análisis de área-bajo-la-curva para la totalidad del experimento de 6 semanas indicó que no hubo diferencias significativas en la proporción de chinchas que se alimentaron con los dos métodos. Hubo significativamente más chinchas vivas en el grupo de baño de agua en las semanas 5 y 6 ( $P = 0,04$  y  $P = 0,02$ , respectivamente), y esta diferencia fue apoyada por el análisis de área bajo la curva ( $P = 0,03$ ). A partir de la evaluación de las primeras 100 ninfas, se produjo un adulto en las semanas 5 y 6 con un total de tres adultos producidos mediante el método del baño de agua, mientras que el método de placa de Petri produjo dos adultos en la semana 5 y cuatro adultos para la semana 6. No hubo diferencias significativas ( $P = 0,9$ ) entre el baño de agua y los métodos de placa de Petri en el período de tiempo de 6 semanas para producir los adultos.

#### 3.2 Cepa de laboratorio de chinchas alimentadas durante 30 min

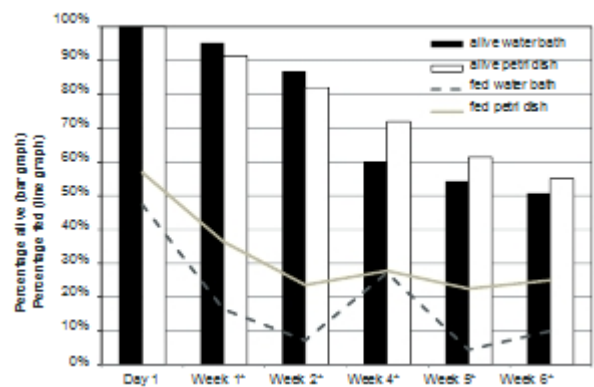


Figura 6. Datos combinados para el porcentaje de chinchas de cepas de laboratorio y de campo que se alimentaron y estaban vivas ( $n = 80$ ) después de la oferta semanal de una comida de sangre de 30 min. \* El porcentaje alimentado fue significativamente diferente ( $P \leq 0,05$ ); \*\* El porcentaje vivo fue significativamente diferente ( $P \leq 0,05$ ).

En esta prueba, se permitió que la cepa de laboratorio de chinches de cama se alimentara por 30 min, y se invirtieron los refugios de filtros de papel después de los primeros 15 min. Las chinches de cama no se alimentaron en la semana 3, debido a la sangre coagulada, y no se hicieron observaciones. El análisis semanal mostró que había significativamente más chinches que se alimentaban mediante el método de placa de Petri en el día 1 ( $P = 0,01$ ), la semana 1 ( $p < 0,05$ ), la semana 2 ( $p = 0,01$ ) y la semana 5 ( $P = 0,05$ ), mientras que en la semana 4 fueron significativamente más las alimentadas utilizando el método de baño de agua ( $P = 0,01$ ) (Fig. 4). En la semana 4, un número significativamente mayor de chinches de cepa de laboratorio estaban vivas utilizando el método de placa de Petri ( $P = 0,01$ ); sin embargo, el análisis de área bajo la curva para las primeras 6 semanas no mostró diferencias significativas en el número de chinches de la cepa de laboratorio que se alimentaron o sobrevivieron. La producción de adultos puede haberse retrasado debido a la falta de comida de sangre en la semana 3. Como no se produjeron adultos en la semana 5 o 6, este estudio se llevó a cabo durante 9 semanas. En la semana 7, se produjo un adulto utilizando el método del baño de agua, mientras que se produjeron tres adultos en la semana 8, utilizando el método de placa de Petri. No se produjeron más adultos en cualquiera de los métodos por 9 semanas. No se detectaron diferencias significativas entre el baño de agua y el método de caja de Petri ( $P = 0,08$ ) en el período de tiempo de 9 semanas para producir adultos.

### 3.3 Cepa de chinches de cama de campo alimentadas durante 30 min

Se le permitió a la cepa de chinches de cama de campo alimentarse durante 30 minutos, invirtiendo los escondites del papel de filtro invertido después de los primeros 15 minutos. El análisis semanal mostró que había significativamente más chinches que se alimentaban utilizando el método de la placa de Petri en la semana 4 ( $p = 0,04$ ) y semana 6 ( $p = 0,02$ ) (Fig. 5). El área bajo la curva no mostró diferencias significativas en el número de chinches que se alimentaban o sobrevivieron para la cepa de campo después de alimentarse durante 30 minutos por semana. Las únicas muertes relacionadas con la alimentación se produjeron en la semana 4, mientras se alimentaba a la cepa de campo. Una pérdida de sangre por el método de baño de agua mató a cuatro ninfas en un frasco. Este estudio se llevó a cabo durante 7 semanas, y en las semanas 5, 6 y 7 se observaron dos, seis y nueve adultos, respectivamente, utilizando el método de placa de Petri. En la semana 7 se produjo un adulto utilizando el método del baño de agua. En la semana 7 se encontraron 10 huevos y dos ninfas, utilizando el método de placa de Petri. No hubo diferencias significativas entre el baño de agua y los métodos de cápsula de Petri ( $P = 0,27$ ) en el tiempo de 7 semanas para producir los adultos.

### 3.4 Análisis combinado de cepas de chinches de laboratorio y de campo alimentadas durante 30 min

Usando un análisis de área-bajo-la-curva, los datos combinados de la cepa de laboratorio y de campo chinches alimentados durante 30 minutos mostraron que significativamente más chinches se alimentaron utilizando el método de placa de Petri ( $P = 0,02$ ) (Fig. 6). El análisis de los datos por semana mostró que más chinches se alimentaron utilizando el método de placa de Petri en la semana 1 ( $p < 0,05$ ), 2 semanas ( $P < 0,05$ ), 5 semanas ( $P < 0,05$ ) y 6 semanas ( $P < 0,02$ ) (Fig. 6). En la semana 4, un número significativamente mayor de chinches estaban vivas cuando se alimentaron con el método de placa de Petri ( $P = 0,02$ ). El número total de adultos producidos utilizando el método de baño de agua durante las 7 semanas fue de dos, y el número total de adultos producidos utilizando el método de placa de Petri fue nueve. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los métodos de baño de agua y de placa de Petri ( $P = 0,83$ ) en el período de tiempo de 8 semanas para producir adultos.

## 4 DISCUSIÓN

Una ventaja de usar el método de la placa de Petri para mantener las chinches de cama en el laboratorio es su relativa simplicidad. A diferencia del método del baño de agua, que requiere cristalería especializada y un baño de agua circulante, las placas de Petri y una placa caliente que se utilizan en el método de placa de Petri son suministros de laboratorio comunes. Para este estudio, se usa la placa caliente digital de Super-Nuova Barnstead / Thermolyne porque permite que la temperatura se pueda ajustar en incrementos de  $1^\circ\text{C}$ , y se podría lograr una temperatura más baja de  $37^\circ\text{C}$  mediante la comparación con la mayoría de los platos calientes de laboratorio. Dependiendo del tamaño de la superficie de la placa caliente, se pueden configurar al mismo tiempo nueve platos de alimentación de chinches de cama. El número de contenedores de crianza de chinches de cama que puede ser alimentado a la vez utilizando el método de baño de agua depende del número de piezas especiales de cristalería disponibles. Esta cristalería especializada puede ser cara (alrededor de 250 dólares cada uno) y / o difícil de encontrar, y a menudo tiene que ser hecha por encargo por una empresa de vidrio. Para este estudio, se utilizó una placa caliente digital que cuestan alrededor de 800 dólares como fuente de calor para calentar la sangre que se utiliza para el método de placa de Petri. Sin embargo, un dispositivo menos costoso utilizado como fuente de calor en el laboratorio de los autores para mantenimiento rutinario de colonias de chinches de cama es una estera de calefacción para reptiles (Zoo Med ReptiTherm calentador UNDERTANK; Zoo Med Laboratories, Inc., San Luis Obispo, CA). La limpieza de las placas de Petri en el método de placa de Petri no es necesaria ya que estas placas son desechables, mientras que el material de vidrio utilizado en el método del baño de agua debe ser lavado antes de volver a usarlo. Las rasgaduras se producen en la membrana de Parafilm usando cualquiera de los métodos de alimentación. Sin embargo, para el método de baño de agua estas rasgaduras son más perjudiciales para los insectos ya que la sangre a menudo se fuga hacia abajo en el frasco en el que se encuentran. En el método de placa de Petri, los insectos se encuentran en la parte superior de la fuente de la sangre, por lo que las rasgaduras en la membrana Parafilm no resultan en una inundación del frasco de cría por la sangre; en su lugar las fugas de sangre mojan la pantalla de organza que cubre la parte inferior del recipiente. Cuando ocurre esto, se puede salvar los insectos con sólo moverlos a un nuevo frasco. En el presente estudio hubo algunos casos de fugas de sangre cuando se usó el método del baño de agua, y los insectos fueron removidos y colocados en recipientes nuevos rápidamente. En un caso, con la cepa de campo alimentada durante 30 min, murieron cuatro ninfas debido a una fuga en el Parafilm usando el método de baño de agua.

La sangre utilizada para alimentar a las chinches de cama en este estudio se calentó a  $37^\circ\text{C}$ , pero la temperatura fluctuó entre  $37-40^\circ\text{C}$  tanto en el baño de agua y el método de placa de Petri. Factores externos y fluctuaciones de temperatura durante el tiempo de alimentación asignada podrían haber contribuido a la variación en el número de insectos que se alimentaron cada semana. Otros estudios podrían investigar si el tamaño de la población influye en la alimentación. La baja supervivencia podría deberse a una lesión causada por el manejo de las ninfas; otra posibilidad es que la deshidratación pueda haber contribuido a la mortalidad. En el campo, las chinches forman

agregaciones que se cree que las protegen contra la pérdida de agua y ayudan a las chinches de cama para evitar desecación.<sup>14</sup> Con sólo diez ninfas de primer estadio en cada contenedor, la desecación puede haber contribuido al aumento de la mortalidad observada en este estudio. En experimentos en los que se permitió que los insectos se alimentaran durante 15 min, la cepa de laboratorio alimentada utilizando el método de placa de Petri tenía significativamente menor supervivencia. La baja supervivencia para esta población podría deberse en parte al hecho de que se alimentó un porcentaje más bajo de insectos (a excepción de 5 semanas) en comparación con el método de baño de agua (Fig. 3). Sin embargo, esto no pareció afectar a la producción de los adultos, porque emergieron en 5 semanas en ambos métodos: dos en el método de la placa de Petri y uno en el método de baño de agua.

El análisis combinado de cepas de laboratorio y de campo que se alimentaron durante 30 minutos mostró más chinches alimentadas por el método de placa de Petri. Como el papel de filtro se giró después de los primeros 15 minutos, esta perturbación puede haber causado que las chinches fueran más activas. En los tres casos, porque los insectos se encuentran por encima de la sangre calentada en el método de la placa de Petri, es posible que ciertas chinches de la cama fueran capaces de detectar la fuente de sangre caliente más rápidamente que en el método del baño de agua debido al calor radiante que fluye hacia arriba en el recipiente, mientras que los insectos se encuentran por debajo de la sangre caliente en el método del baño de agua. El tiempo requerido para comenzar la alimentación y el periodo de tiempo durante el cual los insectos se alimentaron no se pudo determinar debido a la dificultad de la observación directa de todos los insectos en los recipientes de alimentación. Si se emplean frascos más grandes que los utilizados en el presente estudio para el mantenimiento regular de colonias, serían necesarias placas de Petri más grandes y un mayor volumen de sangre por placa. Los contenedores más grandes también pueden aumentar el tiempo necesario para que las chinches de cama comiencen la alimentación, porque los insectos se encuentran más lejos de la membrana Parafilm y pueden no ser capaces de sentir el calor tan rápido como los insectos que se encuentran más cerca de la membrana, o podría tomarles más tiempo llegar a la membrana y comer. Adkins y Arant<sup>15</sup> informaron de que la alimentación de chinches de la cama directamente en conejos 3 veces a la semana redujo la mortalidad en ninfas de primer estadio y resultaron en la producción superior de huevos. Si la alimentación de una colonia de chinches de cama con un huésped vivo o el uso de un enfoque artificial tal como el método de placa de Petri, proporciona a la colonia más de una oportunidad cada semana para alimentarse, es preferible pero puede no ser práctico debido al esfuerzo adicional requerido. En las propias colonias de los autores, se observó que no todas las chinches de la cama optaban por alimentarse incluso cuando la comida sólo se realizaba una vez a la semana. Por lo tanto, es razonable suponer que suministrar más de una oportunidad para alimentarse cada semana podría producir un crecimiento más rápido de la colonia, si al hacerlo significa que se alimentan más individuos en la colonia.

Este estudio proporciona datos cuantitativos que demuestran que el método de placa de Petri es una alternativa viable para el método de baño de agua para la cría de colonias de chinches en el laboratorio. La Universidad de Purdue ha utilizado el método de la placa de Petri para mantener colonias de chinches durante 1,5 años. El método de la placa de Petri se ha utilizado exclusivamente en el laboratorio de los autores para la cría de chinches de la cama desde 2008. Actualmente, se utilizan un plato caliente y una estera de calefacción para reptil para alimentar a 13 frascos de crianza de chinches a la vez, lo que significa que se requiere menos tiempo para alimentar a las colonias de chinches de cama. En lugar de un bucle se utiliza un disco de papel de 55 cm Whatman N ° 1 de filtro, y no es necesario girar el papel de filtro. Se aumentó el citrato de sodio en la sangre de conejo a 3,8% para prevenir la coagulación. Las necesidades de equipo relativamente sencillo y los requisitos de tiempo más pequeños para el método de la placa de Petri hacen que sea un método alternativo atractivo para la alimentación y crianza artificial de chinches. Este método no se limita a la crianza y también puede ser beneficiosa para otros tipos de bioensayo.

#### AGRADECIMIENTOS

The authors thank the University of Florida Department of Entomology for providing laboratory strain bed bugs used to establish the present colony, C Wang and M Abou El-Nour for assistance in collecting bed bugs used to establish the field strain colony and the Indianapolis Housing Agency for providing access to apartments where bed bugs were collected. The authors also thank A Romero for discussions and advice on bed bug rearing, J Neal for helpful suggestions on an early version of this manuscript and J Chastain for technical support in maintaining bed bug colonies.

#### REFERENCIAS

- 1 Boase C, Bedbugs – back from the brink. *Pestic Outlook* 12:159 –162 (2001).
- 2 Doggett SL, Gears MJ and Russell RC, The resurgence of bed bugs in Australia: with notes on their ecology and control. *Environ Hlth* 4:30 – 38 (2004).
- 3 Anderson AL and Leffler K, Bedbug infestations in the news: a picture of an emerging public health problem in the United States. *J Environ Hlth* 70:24 –27 (2008).
- 4 Johnson CG, The ecology of the bed-bug, *Cimex lectularius* L., in Britain. *J Hyg* 41:345 –61 (1941).
- 5 Pinto LJ, Cooper R and Kraft SK, Bed bug biology, in *Bed Bug Handbook: the Complete Guide to Bed Bugs and their Control*, ed. by Kraft SK. Pinto & Associates, Mechanicsville, MD, p. 53 (2007).
- 6 Reinhardt K, Naylor R and Siva-Jothy MT, Situation exploitation: higher male mating success when female resistance is reduced by feeding. *Evolution* 63:29 –39 (2008).
- 7 Takano-Lee M, Velten RK, Edman JD, Mullens BA and Clark JM, An automated feeding apparatus for in vitro maintenance of the human head louse, *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J Med Entomol* 40:795 –799 (2003).
- 8 Montes C, Cuadrillero C and Vilella D, Maintenance of a laboratory colony of *Cimex lectularius* (Hemiptera Cimicidae) using an artificial feeding technique. *J Med Entomol* 39:675 –679 (2002).
- 9 Usinger RL, Ecology, in *Monograph of Cimicidae (Hemiptera-Heteroptera)*, ed. by Arnett RH Jr, William RW, Stone A, Hodson AC and Rockstein M. Entomological Society of America, College Park, MD, pp. 10 –19 (1966).
- 10 Reinhardt K and Siva-Jothy MT, Biology of the bed bugs (Cimicidae). *Ann Rev Entomol* 52:351 –374 (2007).

- 11 Bell W and Schaefer CW, Longevity and egg production of female bed bugs, *Cimex lectularius*, fed various blood fractions and other substances. *Ann Entomol Soc Am* 59:53 –56 (1966).
- 12 Shaner G and Finney RE, The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67:1051 –1056 (1977).
- 13 SAS/STAT User's Guide , Version 9.2. SAS Institute, Cary, NC (2009).
- 14 Benoit JB, Del Grosso NA, Yoder JA and Denlinger DL, Resistance to dehydration between bouts of blood feeding in the bed bug, *Cimex lectularius*, is enhanced by water conservation, aggregation, and quiescence. *Am J Trop Med Hyg* 76:987 –993 (2007).
- 15 Adkins TR, Jr, and Arant FS, A technique for the maintenance of a laboratory colony of *Cimex lectularius* L. on rabbits. *J Econ Entomol* 52:685 –686 (1959).