



NAPPO

North American Plant Protection Organization

Organización Norteamericana de Protección a las Plantas

MEXICO - USA - CANADA

Normas Regionales de la NAPPO sobre Medidas Fitosanitarias (NRMF)

NRMF 34

**Elaboración de protocolos de tratamiento fitosanitario para
artrópodos plaga reglamentados de frutas o verduras frescas**

Secretaría de la Organización Norteamericana de Protección a las Plantas
1431 Merivale Road, 3rd Floor, Room 140
Ottawa, K1A 0Y9 Canadá
17 de octubre del 2011

Índice

Página

Revisión	3
Aprobación	3
Implementación	3
Registro de enmiendas	3
Distribución	3
Introducción.....	4
Ámbito	4
Referencias	4
Definiciones, abreviaturas y siglas	5
Perfil de los requisitos	5
Antecedentes	6
Requisitos	7
1. Diseño experimental	7
1.1 Muestras	8
1.2 Artrópodos plaga.....	8
1.3 Frutas y verduras frescas.....	9
1.4 Hospedantes control	9
1.5 Análisis de los datos	9
2. Pruebas.....	10
2.1 Estadio de vida más tolerante del artrópodo plaga	10
2.2 Pruebas de eficacia.....	11
2.3 Pruebas confirmatorias	12
3. Manipulación de frutas y verduras posterior al tratamiento.....	12
4. Interpretación de resultados.....	13
5. Mantenimiento de registros.....	14
Apéndice 1: Análisis estadístico para la elaboración de protocolos de tratamiento fitosanitario para artrópodos plagas en frutas y verduras frescas.....	15

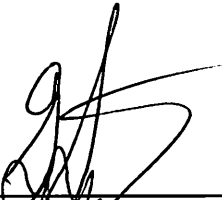
Revisión

Las Normas Regionales de la NAPPO sobre Medidas Fitosanitarias están sujetas a revisiones y enmiendas periódicas. La fecha de la próxima revisión de esta norma de la NAPPO es en el año 2016. De solicitarlo un país miembro de la NAPPO, se pueden llevar a cabo revisiones de cualquier norma de la NAPPO en cualquier momento.

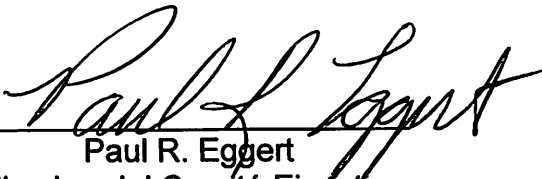
Aprobación

La presente norma fue aprobada por el Comité Ejecutivo (CE) de la Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (NAPPO) el 17 de octubre del 2011 y entrará en vigor a partir de esta fecha.


Aprobada por:



Greg Stubbings
Miembro del Comité Ejecutivo
Canadá



Paul R. Eggert
Miembro del Comité Ejecutivo
Estados Unidos



Javier Trujillo Arriaga
Miembro del Comité Ejecutivo
México

Implementación

Para conocer la fecha de implementación en cada país de la NAPPO, consulte los Planes de implementación adjuntos.

Registro de enmiendas

Las enmiendas a esta norma serán fechadas y archivadas en la Secretaría de la NAPPO.

Distribución

La Secretaría de la NAPPO distribuye esta norma al Grupo Consultivo de la Industria y los Miembros Asociados, la Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) y otras Organizaciones Regionales de Protección Fitosanitaria (ORPFs).

Introducción

Ámbito

El presente documento describe los elementos que deberían considerarse en la elaboración de protocolos de tratamientos fitosanitarios contra artrópodos plaga reglamentados (tales como ácaros, insectos, arañas, milpiés) que se encuentren en frutas o verduras frescas o dentro de ellas, incluido el análisis estadístico que se recomienda.

Referencias

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.

Baker, A.C. 1939. The basis for treatment of products where fruit flies are involved as a condition for entry into the United States. U.S. Dep. Agric., Cir. No. 551.

Baker, R.T., J.M. Cowley, D.S. Harte y E.R. Frampton. 1990. Development of a maximum pest limit for fruit flies (Diptera: Tephritidae) in produce imported into New Zealand. *J. Econ. Entomol.* 83: 13-17.

Busvine, J.R. 1971. A critical review of the techniques for testing insecticides. Commonwealth Agricultural Bureau, Slough, Inglaterra.

Couey, J.M. y V. Chew. 1986. Confidence limits and sample size in quarantine research. *J. Econ. Entomol.* 79: 887-890.

Follett, P.A. y J. Armstrong. 2004. Revised irradiation doses to control melon fly, Mediterranean fruit fly, and oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) and a generic dose for tephritid fruit flies. *J. Econ. Entomol.* 97: 1254-1262.

Follett, P.A. y G.T. McQuate. 2001. Accelerated development of quarantine treatments for insects on poor hosts. *J. Econ. Entomol.* 94: 1005-1011.

Follett, P.A. y L.G. Neven. 2006. Current trends in quarantine entomology. *Ann. Rev. Entomol.* 51: 359-385.

Hallman, G.J. 2007. Considerations for phytosanitary heat treatment research. En: *Heat Treatment for Postharvest Pest Control*, eds. J. Tang *et al.* pp 238-250.

Landolt, P.J., D.L. Chambers y V. Chew. 1984. Alternative to the use of probit 9 mortality as a criterion for quarantine treatments for fruit fly (Diptera: Tephritidae) infested fruit. *J. Econ. Entomol.* 77:285-87.

Mangan R.L., Frampton E.R., Thomas D.B. y D. S. Moreno.1997. Application of the maximum pest limit concept to quarantine security standards for the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 90: 1433-1440.

Neven, L.G. 2010. Postharvest management of insects in horticultural products by conventional and organic means, primarily for quarantine purposes. *Stewart Postharvest Reviews* 6: (1): 1-11(11).

Neven, L.G. 2008a. Development of a model system for rapid assessment of insect mortality in heat controlled atmosphere quarantine treatments. *J. Econ. Entomol.* 101: 295-301.

Neven, L.G. 2008b. Organic quarantine treatments for tree fruits. *HortScience* 43: 22-26.

Neven, L.G. y L. Rehfield-Ray. 2006. Confirmation and efficacy tests against codling moth and oriental fruit moth in apples using combination heat and controlled atmosphere treatments. *J. Econ. Entomol.* 99: 1620-1627.

NIMF 5. (actualizada anualmente). *Glosario de términos fitosanitarios*. Roma, CIPF, FAO.

NIMF 11. 2004. *Análisis de riesgo de plagas para plagas cuarentenarias, incluido el análisis de riesgos ambientales y organismos vivos modificados*. Roma. CIPF, FAO.

NIMF 28. 2007. *Tratamientos fitosanitarios para plagas reglamentadas*. Roma, CIPF, FAO.

NRMF 5. (actualizada anualmente). *Glosario de términos fitosanitarios de la NAPPO*. Ottawa, NAPPO.

Definiciones, abreviaturas y siglas

Las definiciones de los términos fitosanitarios que se utilizan en la presente norma figuran en la NRMF 5 y la NIMF 5.

Perfil de los requisitos

El objetivo de los protocolos de tratamiento fitosanitario es demostrar la mortalidad o esterilización del artrópodo reglamentado objetivo en una fruta o verdura fresca específica o dentro de ella, basándose en datos estadísticos válidos. Las pruebas se realizan en el laboratorio y deberían ser representativas de la variabilidad en la fruta o verdura y el artrópodo objetivo. Los experimentos deberían replicarse, analizarse estadísticamente y notificarse los niveles de confianza basándose en el tamaño de la muestra, de tal forma que los datos puedan verificarse y reproducirse.

Deberían considerarse los siguientes puntos en la elaboración de los protocolos de tratamiento:

- identificar la especie y variedad de fruta o verdura propuestas para la exportación,
- especificar cualquier condición(es) definida(s) de la fruta o verdura que se ha de evaluar,
- identificar la especie de artrópodo objetivo y la etapa de interés,

- describir el origen y la manipulación de los artrópodos objetivo que se han de utilizar en las pruebas,
- describir la fruta o verdura y el artrópodo objetivo que se han de utilizar como control en las pruebas,
- realizar pruebas separadas para cada especie de artrópodo objetivo y combinación de producto para los cuales se requiere la determinación de la eficacia del tratamiento,
- describir el equipo que se utilizará en las pruebas,
- describir en detalle los parámetros de la prueba.

Antecedentes

Los tratamientos fitosanitarios esterilizan o matan los artrópodos plagas reglamentados que se encuentran en frutas o verduras o dentro de ellas para evitar su entrada y establecimiento en áreas en las que no están presentes o que no están ampliamente distribuidos. El incumplimiento del tratamiento podrá dar lugar a la interrupción del comercio y/o introducción de una plaga nueva. Podrán detallarse en un acuerdo bilateral los protocolos para determinar la eficacia de los tratamientos, el nivel aceptable de eficacia y la confianza estadística para las evaluaciones.

El análisis de riesgo de plagas se utiliza con el fin de determinar las medidas fitosanitarias necesarias para lograr el nivel prescrito de seguridad cuarentenaria (NIMF 11: 2004). Entre estas medidas se encuentran los tratamientos fitosanitarios de frutas y verduras que se utilizan como medida independiente o en combinación como parte de un enfoque de sistemas para eliminar o disminuir el riesgo de introducción y dispersión de plagas cuarentenarias. Los programas de tratamientos son los protocolos aceptados por la ONPF para la aplicación de manipulaciones químicas o físicas tal como se especifica para cada artrópodo plaga reglamentado y producto objetivo (NIMF 28: 2007). Los tratamientos químicos incluyen la fumigación con bromuro de metilo, fosfina y otros gases (Neven 2010). Los tratamientos físicos incluyen calor, frío, irradiación, atmósfera controlada y barreras físicas (Follett y Armstrong 2004; Hallman 2007; Neven 2008a, 2008b, 2010). Los detalles relacionados con la irradiación no se incluyen en esta norma puesto que se abarcan en los anexos de la NIMF 28.

Los protocolos de tratamiento estandarizados deberían asegurar resultados uniformes, de alta calidad y deberían facilitar la capacidad de realizar comparaciones entre diferentes productos y especies de plagas. Las deficiencias comunes de los protocolos de tratamiento fitosanitario elaborados por investigadores (Follett y Neven 2006) y presentados para la consideración de las ONPF incluyen, entre otros aspectos:

- tamaño inadecuado de muestra del artrópodo objetivo y/o producto,
- imposibilidad de tratar al estadio más tolerante del artrópodo objetivo,
- tratamiento en la dieta o al aire libre en vez de ser en el producto hospedante,
- informe incompleto o inexacto de métodos experimentales,
- parámetros de tratamiento inadecuados o no informados,
- número insuficiente de dosis de tratamiento,
- rango insuficiente de dosis de tratamiento,
- ausencia de pruebas de validación a gran escala,
- análisis estadístico incorrecto o inapropiado.

Algunas de estas deficiencias podrán estar relacionadas con las dificultades prácticas al realizar este tipo de investigación. Parte del objetivo de esta NRMF es crear conciencia de los posibles problemas que surjan en la elaboración de tratamientos cuarentenarios.

El concepto de probit 9 es la base histórica para definir la eficacia de los tratamientos (Baker 1939). Se deriva del análisis probit que se utiliza como método estadístico con el fin de determinar la relación dosis-respuesta de un tratamiento. La mortalidad o esterilización al nivel probit 9 indica un 99.9968% de eficacia del tratamiento. Se requiere un tamaño de muestra mínimo de 99,613 especímenes para demostrar una respuesta probit 9 a un nivel de confianza del 95% (Follett y Neven 2006). En muchos casos, este tamaño de muestra no es factible debido a la dificultad en la cría del artrópodo objetivo o el nivel bajo de infestación de la fruta o verdura (Follett y McQuate 2001). Couey y Chew (1986) proporcionan métodos cuantitativos para calcular el tamaño mínimo de la muestra y los límites de confianza para otros niveles de eficacia de tratamiento y límites de confianza (Apéndice 1).

Se han propuesto medidas alternativas de eficacia del tratamiento, tales como el límite máximo de la plaga (Landolt *et al.* 1984; Baker *et al.* 1990; Mangan *et al.* 1997). El riesgo, bajo esta medida alternativa, se define como la probabilidad de una pareja con posibilidades de apareamiento, hembra grávida o espécimen con reproducción partenogénica que sobreviva en un envío. El riesgo de supervivencia y reproducción es una función del tratamiento, el nivel de infestación en la naturaleza, la biología de la plaga y hospedante y los sistemas de distribución en el punto de entrada.

Un tratamiento con un nivel elevado de eficacia (probit 9) podrá no ser la única opción aceptable de manejo del riesgo. El beneficio principal de la aplicación de la eficacia de un tratamiento alternativo en la elaboración de protocolos de tratamientos fitosanitarios es que se podrá utilizar un tamaño de muestra más pequeño para demostrar la eficacia necesaria a un nivel de confianza del 95% (por ejemplo, menos de una pareja con posibilidades de aparearse sobrevive en un envío). Un tratamiento con un nivel de eficacia bajo podrá ser un componente de un enfoque de sistemas global con miras a disminuir el riesgo.

Requisitos

1. Diseño experimental

La finalidad de estos experimentos es determinar la eficacia de los protocolos de tratamientos fitosanitarios para el artrópodo objetivo en la fruta o verdura especificada o dentro de ella bajo las condiciones definidas. El diseño específico de los experimentos dependerá de la combinación seleccionada de plaga/producto individual y el análisis estadístico.

1.1 Consideraciones generales

- Los protocolos de muestreo deberían basarse en principios de independencia y aleatoriedad, además de ser apropiados para el análisis estadístico previsto.
- Las pruebas deberían ser apropiadas para evaluar al artrópodo objetivo y la(s) condición(es) definida(s) que se ha(n) especificado de la fruta o verdura.
- El número de réplicas por prueba debería considerar la variabilidad en artrópodos objetivo y la fruta o verdura en toda el área de producción. El número de réplicas debería ser representativo del rango de producción actual y de las condiciones del cultivo, por ejemplo, cultivo que crece en elevación alta o baja. Se podrán realizar ajustes según la biología del artrópodo objetivo o de las características de la fruta o verdura.
- El nivel deseado de eficacia podrá ser el mismo que el límite máximo de la plaga de menos de 1 par reproductivo por envío (Mangan *et al.* 1997). Podrá ser apropiado establecer un nivel de eficacia del tratamiento más bajo si la probabilidad de establecimiento de la especie en el país importador es baja debido al clima, la disponibilidad de hospedantes u otros factores; o si se aplican otras medidas fitosanitarias como parte de un enfoque de sistemas.
- Debería haber un límite de confianza del 95% sobre todas las réplicas para el nivel de eficacia necesario. Si se aplica un límite de confianza menor del 95%, debería haber una justificación apropiada.
- El número y peso de la fruta o verdura debería ser suficiente para determinar la eficacia y el nivel de confianza del tratamiento. Debería documentarse el número de artrópodos objetivo individuales que se utilizan en cada réplica y el número de especímenes que sobreviven en los controles en comparación con los tratamientos.
- Este número debería ser suficiente para determinar la eficacia y los niveles de confianza.
- Debería documentarse el número de frutas o verduras control que se utilizarán para la dosis-respuesta, eficacia y pruebas confirmatorias.

1.2 Artrópodos plaga reglamentados

- De ser posible, el artrópodo objetivo que se utilice en las pruebas debería proceder de la misma área que la fruta o verdura, por ejemplo, área de producción comercial.
- De ser posible, la colonia de artrópodos objetivo debería ser no mayor de tres generaciones al inicio de las pruebas, sin repoblarse, y debería conservarse en hospedantes naturales para mantener la fisiología y el comportamiento normal. De lo contrario, podrá ser necesario un experimento para comparar la eficacia del tratamiento entre el laboratorio y las poblaciones silvestres.
- Se podrán utilizar las poblaciones naturales para infestar al producto o se podrá utilizar el producto infestado en forma natural cuando las colonias en el laboratorio no estén disponibles.
- Deberían mantenerse registros sobre el origen y la manipulación del artrópodo objetivo que esté reglamentado, incluyendo la temperatura, humedad relativa y el fotoperíodo.
- Debería mantenerse accesible la identificación de los especímenes de referencia.
- Debería documentarse el método de infestación.

1.3 Frutas y verduras frescas

Las pruebas deberían ser apropiadas para evaluar el tratamiento y cualquier condición(es) definida(s) que se haya(n) especificado de la fruta o verdura.

En el desarrollo del tratamiento la fruta o verdura que se utilice para la prueba debería:

- documentarse de acuerdo a la especie, variedad (por ejemplo, documentación fotográfica e identificación por un botánico) y origen de la fruta o verdura que está recibiendo tratamiento,
- clasificarse según el grado comercial para el color, tamaño, estado de madurez y condición fisiológica,
- conservarse bajo condiciones definidas que sean iguales a las prácticas de manipulación comercial antes del tratamiento (por ejemplo, lavado, encerado, asperjado, etc.).

1.4 Hospedantes control

En el desarrollo del tratamiento, los controles son necesarios para todas las pruebas. El hospedante control debería ser la misma fruta o verdura que se está evaluando en las pruebas de dosis-respuesta. El hospedante control debería estar infestado y conservarse bajo los mismos parámetros que el hospedante bajo tratamiento. Los artrópodos objetivo que se utilizan en el control y la réplica experimental deberían provenir todos del mismo grupo, la colonia, variedad o población y tener la edad y condiciones apropiadas para fomentar la infestación. Debería reservarse cinco por ciento o más del número total de las frutas o verduras infestadas como controles sin tratamiento. El número total de artrópodos objetivo con tratamiento debería calcularse del número de artrópodos objetivo que sobrevive en los controles sin tratamientos.

Los controles se utilizan para:

- confirmar que las condiciones ambientales fueron apropiadas para la infestación y supervivencia,
- indicar el período de tiempo normal para el desarrollo de la plaga,
- indicar el nivel alto de infestación que podrá ocurrir en un hospedante,
- verificar que la población de artrópodos objetivo utilizada en la prueba es capaz de sobrevivir en el hospedante,
- documentar la mortalidad en el control.

1.5 Análisis de los datos

- La eficacia de los tratamientos fitosanitarios de las frutas o verduras y el nivel de confianza deberían calcularse a partir del número de supervivientes comparado con el control (Apéndice 1).
- Las correcciones para la mortalidad en el control deberían calcularse conforme a Abbott (1925).
- El tamaño de la muestra necesario para las pruebas de eficacia y confirmatoria deberían ajustarse basándose en la mortalidad en el control (Follett y Neven 2006, Apéndice 1).

2. Pruebas

Hay diferentes tipos de pruebas para la elaboración de los protocolos de tratamiento. El primer nivel es la determinación del estadio de vida más tolerante; el segundo es la prueba de eficacia (por lo general, prueba de dosis/mortalidad) y el tercero son las pruebas confirmatorias para validar el tratamiento mínimo a escala comercial.

2.1 Estadio de vida más tolerante del artrópodo plaga

Es obligatorio determinar el estadio de vida que sea más tolerante al tratamiento que se propone. Si existen datos suficientes para una plaga específica utilizando un tratamiento específico, entonces posiblemente no sea necesario realizar este nivel de prueba. Este es el estadio de vida que debe utilizarse en la prueba de eficacia y pruebas confirmatorias.

La determinación del estadio de vida más tolerante debería incluir, entre otros aspectos, lo siguiente:

- la evaluación de cada estadio de vida del artrópodo objetivo que está presente o en desarrollo en la fruta o verdura o dentro de ella durante el período de cosecha o posterior a éste,
- la generación de una curva dosis-respuesta para cada estadio de vida,
 - un mínimo de cinco (5) niveles de tratamiento que proporcione < 100% de mortalidad y un control sin tratamiento,
 - un mínimo de 50 especímenes de artrópodos objetivo por réplica, de ser posible,
 - un mínimo de (4) réplicas por nivel de tratamiento y control sin tratamiento,
- la documentación de los parámetros ambientales de la cría de artrópodos objetivo,
- la documentación de las condiciones de conservación de los artrópodos objetivo y frutas o verduras antes del tratamiento,
- la documentación de los parámetros del tratamiento,
 - procedimientos para la infestación natural y/o artificial de frutas o verduras,
 - tipo de tratamiento,
 - detalles específicos del tratamiento,
 - nivel de tratamiento (por ejemplo, temperatura, cantidad de fumigante),
 - período de tratamiento (duración),
 - nivel de aplicación del tratamiento,
 - rango de temperatura,
 - humedad relativa,
 - nivel de eliminación del tratamiento (por ejemplo, nivel de enfriamiento),
 - otros parámetros pertinentes necesarios para repetir el tratamiento,

- método de tratamiento aplicado,
- descripción detallada del equipo que se utilizó,
 - calibración de todo el equipo y dispositivos de medición,
 - mapeo de la dosis de la cámara,
 - dispositivos de medición,
- documentación de los parámetros posterior al tratamiento,
 - las condiciones deberían apoyar la supervivencia, el desarrollo y la reproducción del artrópodo objetivo, si ese estatus es pertinente para el protocolo de tratamiento,
 - los controles sin tratamiento deberían sobrevivir y reproducirse normalmente, si ese estatus es pertinente para el protocolo de tratamiento,
 - las pruebas deberían repetirse si la mortalidad en el control es $\geq 20\%$, salvo si la biología del artrópodo objetivo justifica un nivel de mortalidad más alto (Busvine, 1971).
- En algunos casos, dos o más artrópodos podrán ser el objetivo del mismo tratamiento en una fruta o verdura (Neven y Rehfield-Ray 2006). La especie que es más tolerante al tratamiento podrá determinarse mediante una comparación directa de la especie en las pruebas de dosis-respuesta. El estadio de vida más tolerante de la especie más tolerante debería entonces utilizarse en las pruebas de eficacia y confirmatorias.

2.2 Pruebas de eficacia

Las pruebas de eficacia se realizan en el estadio de vida más tolerante para establecer el nivel de tratamiento mínimo en las pruebas confirmatorias. El nivel de tratamiento mínimo es el TL_{99} tal como se calculó a partir de la curva dosis-respuesta en las pruebas de estadios de vida más tolerantes. Las pruebas de eficacia deberían incluir, entre otros aspectos, lo siguiente:

- se utilizará el estadio de vida más tolerante del artrópodo objetivo que está presente o en desarrollo en la fruta o verdura o dentro de ella durante el período de cosecha o posterior a éste,
- debería documentarse la metodología para calcular el estadio de vida más tolerante,
- criterios de los tratamientos:
 - un nivel mínimo de tratamiento equivalente al TL_{99} calculado en las pruebas de estadios de vida más tolerantes,
 - un control sin tratamiento,
 - cuatro (4) réplicas por nivel de tratamiento,
 - un número mínimo de especímenes del estadio de vida más tolerante que hayan recibido tratamiento y que estén muertos, sin supervivientes. El número que se escoja dependerá de los factores biológicos, peso de la plaga, disponibilidad del producto y los requisitos de los países importadores,
 - el número de artrópodos objetivo en el control sin tratamiento debería equivaler entre el 5 al 10% del total.
- documentación de los parámetros del tratamiento tal como se indica en el apartado 2.1,

- una descripción completa del equipo que se utilizó tal como se estipula en el apartado 2.1,
- documentación de los parámetros posteriores al tratamiento tal como se indica en el apartado 2.1.

2.3 Pruebas confirmatorias

Las pruebas confirmatorias son necesarias para validar el nivel mínimo de tratamiento a escala comercial. Los datos de las pruebas de eficacia se utilizan para definir los parámetros de la prueba confirmatoria. Deberían definirse el nivel de confianza, número de artrópodos objetivo y nivel mínimo de tratamiento.

La prueba confirmatoria debería incluir, entre otras cosas, lo siguiente:

- se utilizará el estadio de vida más tolerante del artrópodo objetivo que está presente en la fruta o verdura o dentro de ella durante la cosecha o posterior a ésta,
- documentación de la metodología para determinar que el estadio de vida más tolerante está presente en la fruta o verdura o dentro de ella al momento del tratamiento,
- criterios de los tratamientos:
 - el nivel mínimo de tratamiento determinado en la prueba de eficacia,
 - un control sin tratamiento,
 - un número mínimo de especímenes del artrópodo objetivo muertos sin supervivientes debería ser suficiente para apoyar el análisis estadístico apropiado y proporcionar al país importador confianza aceptable en el tratamiento,
 - puede alcanzarse el número mínimo de especímenes con tratamiento sumando los resultados de varias pruebas,
 - el número de especímenes del artrópodo objetivo en el control sin tratamiento debería ser como mínimo entre 5 al 10% del total,
- los recipientes de la fruta o verdura que se utilizan durante el tratamiento deberían ser los mismos que los que se espera utilizar en la aplicación comercial del tratamiento (cuando corresponda),
- documentación de los parámetros del tratamiento tal como se indica en el apartado 2.1,
- una descripción completa del equipo que se utilizó tal como se estipula en el apartado 2.1,
- documentación de los parámetros posteriores al tratamiento tal como se indica en el apartado 2.1.

3. Manipulación de frutas y verduras posterior al tratamiento

Las frutas o verduras con tratamiento y de control podrán conservarse hasta que el artrópodo objetivo madure, si resulta pertinente para el protocolo de tratamiento. Las condiciones para conservar la fruta o verdura deberían optimizar la supervivencia del artrópodo objetivo y especificarse en el diseño del experimento.

Los criterios para manipular frutas o verduras deberían documentarse incluyendo, entre otras cosas:

- temperatura,
- humedad relativa,
- fotoperíodo,
- medio de conservación,
 - sin plaguicida,
 - estéril,
 - bien drenado para evitar mortalidad de artrópodos debido al exceso de humedad,
- restringir el acceso de otros organismos que puedan interferir con cualquiera de los estadios de vida del artrópodo objetivo,
- registrar el número de especímenes de artrópodos objetivo y los estadios de vida de cada fruta o verdura para cada réplica,
- mantener los controles separados de las frutas y verduras que han recibido tratamiento.

Los datos que deberían registrarse incluyen, entre otros aspectos:

- las condiciones ambientales diarias durante el período en que se conserva la fruta o verdura,
- número, estadio de vida y fechas de emergencia de artrópodos objetivo que se desarrollan en la fruta o verdura o dentro de ella y el hospedante control, en cuanto sea pertinente para el tratamiento (Apéndice 1),
- capacidad de los artrópodos objetivo supervivientes para desarrollarse y/o reproducirse, si resulta pertinente para el tratamiento,
- desviaciones de la morfología normal y comportamiento ,
- los números que emerjan de la fruta o verdura o los que se desarrollen en éstas deberían compararse con los del control.

4. Interpretación de resultados

Los siguientes puntos, entre otros, deberían considerarse en la interpretación de los datos de los protocolos de tratamiento:

- el nivel mínimo del tratamiento puede confirmarse en las pruebas de eficacia validadas estadísticamente y pruebas a escala comercial con el estadio de vida más tolerante y el producto de calidad comercial,
- las condiciones definidas del tratamiento que se han evaluado y confirmado en las pruebas pueden designarse como un requisito para cumplir con el nivel apropiado de protección,
- el nivel de mortalidad alto ($\geq 20\%$) en controles sin tratamiento podrá ser indicio de un problema en cuanto a las condiciones experimentales, los procedimientos de infestación u otros asuntos que afectan en forma negativa la supervivencia del artrópodo. La prueba debería repetirse y las condiciones de la prueba podrán requerir modificación,
- otras opciones de manejo del riesgo (por ejemplo, enfoque de sistemas) por lo general se requieren para lograr el nivel apropiado de protección, tal como lo determine la ONPF del país importador, si la eficacia del tratamiento está por debajo del nivel TL_{99} .

5. Mantenimiento de registros

La ONPF debería mantener registros apropiados de pruebas de desarrollo de tratamiento fitosanitario. La información que se mantenga debería ser la adecuada para el fin previsto de demostrar la eficacia de los tratamientos. La información en los registros debería incluir, entre otros aspectos:

- el nombre científico del artrópodo objetivo,
- el nombre científico y la variedad de la fruta o verdura,
- la ubicación de los especímenes de referencia,
- las pruebas realizadas, las condiciones definidas, el diseño del experimento, las fechas, ubicaciones, los datos, cálculos estadísticos y resultados,
- las referencias.

Para cada combinación de especie de artrópodo objetivo y fruta o verdura, la ONPF del país exportador debería proporcionar a la ONPF del país importador los informes sobre los resultados de las pruebas de desarrollo de tratamiento, de conformidad con esta norma. Se exhorta la publicación de las pruebas de tratamiento en las revistas científicas con revisión externa.

Apéndice 1: Análisis estadístico para la elaboración de protocolos de tratamiento fitosanitario para artrópodos plagas en frutas y verduras frescas

1.1 Mortalidad en el control

Debería realizarse un cálculo de la respuesta del tratamiento después de corregir los datos de dosis-respuestas para la mortalidad en el control (Abbott 1925). Los datos corregidos de la dosis-respuesta deberían utilizarse en comparaciones entre tratamientos.

1.2 Dosis-respuesta

Los análisis estadísticos para detectar diferencias considerables entre los niveles de tratamiento podrán incluir, entre otros aspectos:

- análisis de probit,
- análisis factorial de varianza,
- regresión lineal y análisis de covarianza mediante un modelo de mínimos cuadrados,
- las medias deberían separarse con una prueba pos-hoc apropiada (por ejemplo, diferencia significativa honesta de Tukey, rango múltiple de Duncan).

Los datos de dosis-respuesta corregidos (datos del porcentaje de mortalidad) podrán transformarse para normalizar la distribución antes del análisis estadístico en donde se supone una distribución normal (Follett y Armstrong 2004; Neven 2008 a, b).

1.3 Cálculo del tamaño de la muestra

La eficacia de los tratamientos fitosanitarios de frutas o verduras y su nivel de confianza deberían calcularse a partir del nivel de infestación, el cual es el número de artrópodos plaga objetivo que sobrevivan al tratamiento y el control (Couey y Chew 1986). Al desarrollar tratamientos cuarentenarios para frutas o verduras, como el tratamiento con agua caliente, se determina el nivel de confianza relacionado con el tratamiento que se ofrece a un número de artrópodos plagas sin ningún superviviente, mediante la siguiente ecuación

$$C = 1 - (1 - p_u)^n \quad (1)$$

en donde p_u es la proporción de infestación máxima que se permite (por ejemplo, 0.0001 por un 99.99% de mortalidad) y n es el número de insectos de ensayo (Couey y Chew 1986). La ecuación 1 puede reordenarse para determinar el número de insectos que se necesitan para los ensayos a un nivel de confianza dado.

$$n = [\log(1-0.95)/\log(1- p_u)] \quad (2)$$

La ecuación 2 calcula la cantidad de insectos (n) que deben haber en los ensayos que no tengan supervivientes para lograr un 95% de confianza (C ,

como proporción) de que la proporción de supervivencia sea inferior al nivel predeterminado (p_u) (Couey y Chew 1986).

El tamaño de la muestra necesario para las pruebas de eficacia y confirmatorias debería ajustarse para dar cuenta de la mortalidad del control (Follett y Neven 2006). El tamaño de muestra ajustado es,

$$a = n/(s_c) \quad (3)$$

en donde n se deriva de la ecuación 2 y s_c es el porcentaje de supervivientes en el control dividido entre 100.

1.4 Cálculo del nivel de confianza

Couey y Chew (1986) presentan una ecuación para calcular los niveles de confianza para la eficacia solo cuando algunos insectos sobreviven en el hospedante,

$$\sum_{x=0}^{x=s} e^{-m} m^x / x! = 1 - C \quad (4)$$

en donde m es $n \times p_u$; n es el número de insectos o frutas o verduras muestreadas; s es el número de supervivientes y C es el nivel de confianza. Esta ecuación utiliza la ley de distribución de Poisson que supone n grande y p_u pequeña (Couey y Chew 1986). Se espera que la mayoría de las frutas y verduras en ensayos de desarrollo del protocolo de tratamiento tengan 0 ó 1 superviviente y una distribución Poisson, los cuales estos modelos suponen podrán ser los más apropiados (Baker *et al.* 1990).