

Instrucciones para la Evaluación de la Resistencia a Insecticida en Vectores mediante del Ensayo Biológico de la Botella de los CDC



ÍNDICE

1. Introducción	5
2. Material y reactivos	5
2.1. Material	5
2.2. Reactivos.....	6
2.3. Material biológico.....	6
3. Consideraciones iniciales.....	7
3.1. Dosis diagnóstica y tiempo de diagnóstico	7
3.2. Preparación de soluciones stock.....	8
3.3. Manipulación de mosquitos	9
3.4. Limpieza y secado de botellas antes del recubrimiento.....	10
3.5. Rotulado de botellas	11
3.6. Recubrimiento de botellas	11
4. Método del ensayo biológico de la botella de los CDC.....	12
4.1. Consideraciones generales.....	12
4.2. Ensayo biológico.....	13
4.3. Manipulación de botellas recubiertas	15
4.4. Identificación de mecanismos de resistencia.....	15
4.5. Validez de los resultados.....	15
4.6. Interpretación de los resultados.....	16
5. Vigilancia epidemiológica de la resistencia.....	18
5.1. Antecedentes	18
5.2. Características del surgimiento de resistencia.....	18
5.3. Naturaleza focal de resistencia	18
5.4. Resistencia y control de enfermedades	18
5.5. Orientaciones generales.....	19
6. Ensayo biológico de la botella de los CDC con sinergistas.....	19
6.1. Antecedentes	19
6.2. Utilización de sinergistas.....	21
6.3. Preparación de botellas para ensayos biológicos con sinergistas.....	22
6.4. Ensayo biológico de la botella de los CDC con sinergistas	22
6.5. Interpretación de ensayos biológicos con sinergistas.....	23
7. Bibliografía.....	23
Apéndice 1. Preguntas frecuentes.....	24
Apéndice 2. Dosis diagnóstica y calibración del ensayo biológico	26
Apéndice 3. Formulario para registro de datos	28

PRÓLOGO

La resistencia a un insecticida en una población de vectores es inicialmente detectada y caracterizada usando alguna clase de ensayo biológico para determinar si un insecticida en particular puede controlar un vector en un momento en particular. Esta es una pregunta fundamental que idealmente se debería contestar antes de que un insecticida en particular sea escogido y adquirido para el control de vectores.

El ensayo biológico diseñado por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, Centers for Disease Control and Prevention) de los Estados Unidos es una herramienta de vigilancia para detectar la presencia de resistencia a insecticidas en poblaciones de vectores. El ensayo ha sido diseñado para ayudar a determinar si una determinada formulación de un insecticida puede controlar un vector de un lugar específico en un momento en particular. Esta información, combinada con resultados de ensayos biológicos mediante sinergistas y de pruebas bioquímicas y moleculares, puede ayudar a determinar cual insecticida se debería usar para controlar la población de un vector en caso de detectar resistencia.

El objetivo de este documento es proveer instrucciones prácticas de laboratorio que describen cómo realizar el ensayo biológico de la botella de los CDC e interpretar sus resultados. Información complementaria para las pruebas de resistencia se puede obtener en el sitio Web de los CDC <http://www.cdc.gov/malaria>.

Esperamos que esta herramienta sea de utilidad y beneficie los programas de control de vectores.

Sinceramente,

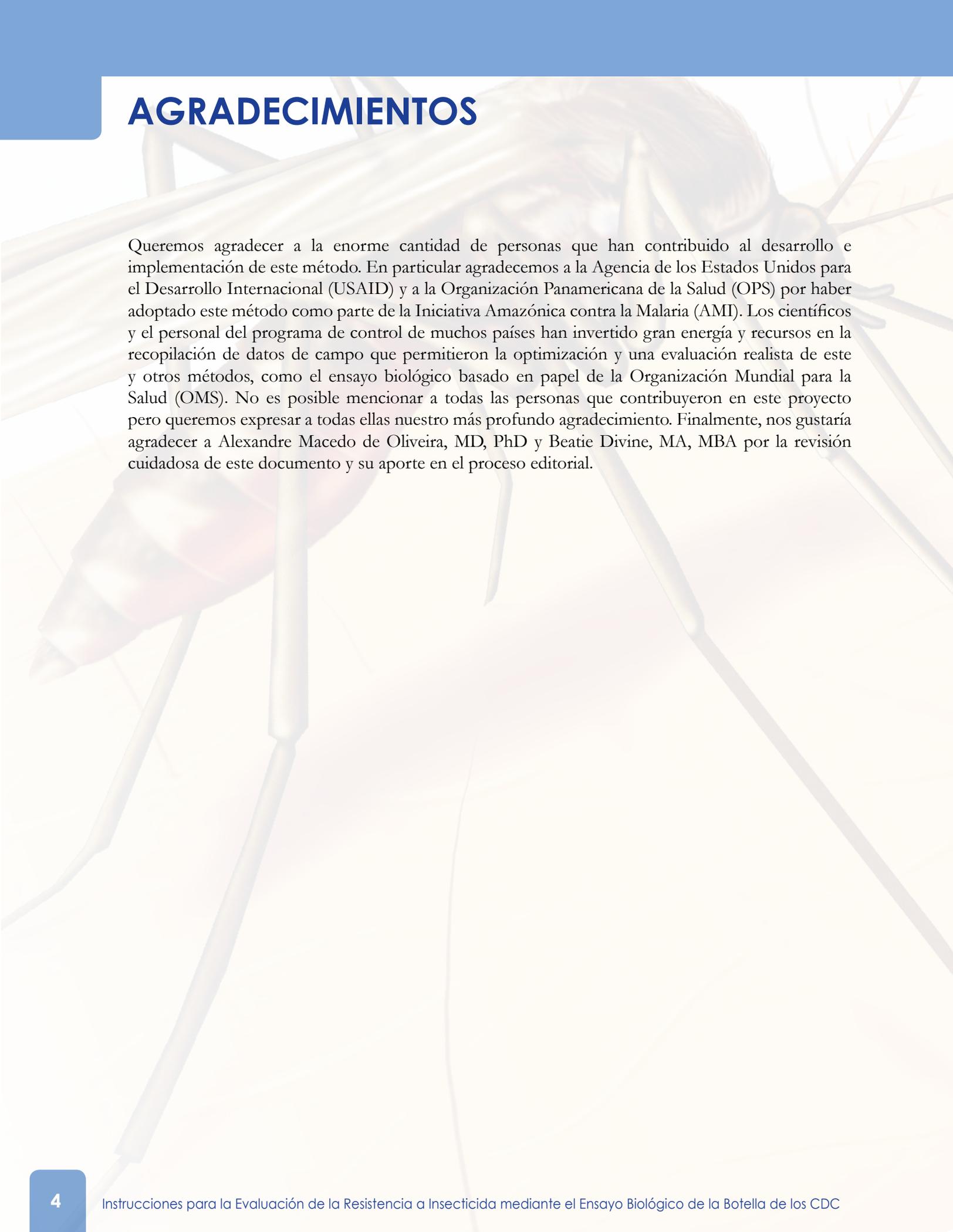
William G. Brogdon, PhD
Research Entomologist
Entomology Branch
Division of Parasitic Diseases and Malaria
Centers for Disease Control and Prevention

1600 Clifton Road, MS G-49
Atlanta, GA 30329 USA
Tel: +1 404.718.4303
Fax: +1 404.718.4355
Correo electrónico: WBrogdon@cdc.gov

Adeline Chan, PhD
Research Entomologist
Entomology Branch
Division of Parasitic Diseases and Malaria
Centers for Disease Control and Prevention

1600 Clifton Road, MS G-49
Atlanta, GA 30329 USA
Tel: +1 404.718.4305
Fax: +1 404.718.4355
Correo electrónico: AChan@cdc.gov

AGRADECIMIENTOS



Queremos agradecer a la enorme cantidad de personas que han contribuido al desarrollo e implementación de este método. En particular agradecemos a la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID) y a la Organización Panamericana de la Salud (OPS) por haber adoptado este método como parte de la Iniciativa Amazónica contra la Malaria (AMI). Los científicos y el personal del programa de control de muchos países han invertido gran energía y recursos en la recopilación de datos de campo que permitieron la optimización y una evaluación realista de este y otros métodos, como el ensayo biológico basado en papel de la Organización Mundial para la Salud (OMS). No es posible mencionar a todas las personas que contribuyeron en este proyecto pero queremos expresar a todas ellas nuestro más profundo agradecimiento. Finalmente, nos gustaría agradecer a Alexandre Macedo de Oliveira, MD, PhD y Beatie Divine, MA, MBA por la revisión cuidadosa de este documento y su aporte en el proceso editorial.

DIRECTRIZ

1. Introducción

Los ensayos biológicos permiten la detección y caracterización de la resistencia a insecticidas en una población de vectores. Este documento describe el ensayo biológico de la botella desarrollado por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos, una herramienta para detectar la resistencia a insecticidas. La información proporcionada por este ensayo biológico, conjuntamente con resultados de ensayos biológicos realizados mediante sinergistas y ensayos bioquímicos y moleculares, puede ayudar también a determinar los mecanismos responsables de la resistencia.

El ensayo biológico de la botella de los CDC se basa en el tiempo de mortalidad de los insectos, el cual se define como el tiempo que tarda un insecticida en penetrar en un vector, recorrer los tejidos intermedios, alcanzar su sitio blanco y actuar sobre el mismo. Cualquier factor que impida o demore al compuesto en lograr su objetivo — matar insectos — contribuye a la resistencia. La información obtenida mediante el ensayo biológico de la botella de los CDC puede además proporcionar evidencia inicial de que un insecticida está perdiendo su efectividad en una población de vectores. Esta metodología debería ser considerada de uso de rutina, aun antes de que un insecticida sea escogido y adquirido para el control de vectores.

El ensayo biológico de la botella de los CDC puede ser realizado en poblaciones de vectores colectados en campo o en poblaciones criadas en un insectario a partir de larvas capturadas en campo. No se recomienda el uso de esta prueba en mosquitos obtenidos a partir de huevos ovipuestos en un insectario.

Una ventaja importante de este ensayo biológico es que se pueden evaluar diferentes concentraciones de un insecticida. Además, la técnica es simple, rápida y económica comparada con otras alternativas. El ensayo biológico de la botella de los CDC puede ser utilizado como parte de un programa más amplio de monitoreo de la resistencia a insecticidas, el cual incluye el ensayo biológico basado en papel de la Organización Mundial para la Salud (WHO, World Health Organization) y los métodos bioquímicos y moleculares.

El ensayo biológico de la botella de los CDC puede ser usado para cualquier especie de insectos. En este documento se utilizarán mosquitos como ejemplo para describir las instrucciones y protocolos.

2. Material y reactivos

2.1. Material

- Botellas Wheaton con tapa de rosca de 250 ml (Figura 1). Para cada ensayo biológico se utilizan normalmente cinco botellas: cuatro para las réplicas de prueba y una para el control;
- Pipetas plásticas graduadas desechables de 1ml, o micropipetas y puntas;

- Aparato aspirador para atrapar mosquitos;
- Envases para transferir/almacenar los mosquitos;
- Botellas para soluciones stock (concentrada). Estas pueden ser de color ámbar o, si se usan botellas transparentes, deben ser envueltas en papel de aluminio (100–1000ml según la preferencia del usuario en cuanto al volumen de solución stock a utilizar);
- Cronómetro con segundero;
- Marcadores indelebles para rotular botellas, tapas y pipetas;
- Cinta adhesiva para etiquetar botellas, tapas y pipetas;
- Guantes desechables;
- Hojas de papel, bolígrafos y lápices para el registro de datos.

2.2. Reactivos

- Insecticida(s) a ser evaluado (grado técnico [puro] o formulaciones);
- Acetona o etanol absoluto de grado analítico.

2.3. Material biológico

- Mosquitos para las pruebas.

Nota: Utilice los procedimientos de seguridad recomendados por su institución para manipular insecticidas (Ej., guantes y batas de laboratorio).



Figura 1: Material y reactivos para el ensayo biológico de la botella de los CDC.

3. Consideraciones iniciales

3.1. Dosis diagnóstica y tiempo de diagnóstico

El primer paso para la estandarización del ensayo biológico de la botella de los CDC es determinar la dosis diagnóstica y el tiempo de diagnóstico. La dosis diagnóstica es la dosis de insecticida que mata el 100 % de mosquitos susceptibles en un tiempo dado. El tiempo esperado para que el insecticida cumpla este objetivo (100% de mortalidad) es llamado tiempo de diagnóstico. Estos parámetros se usan como puntos de referencia para compararlos con los resultados del ensayo biológico. Se asume que existe resistencia en una población si una proporción significativa de esta sobrevive a la dosis diagnóstica en el tiempo de diagnóstico.

La dosis diagnóstica y el tiempo de diagnóstico deben ser definidos para cada insecticida, cada región geográfica a estudiar y cada especie de vector que se va a evaluar. La dosis diagnóstica y el tiempo de diagnóstico deben ser validados usando una población susceptible de vectores colectados en campo. Una vez que se han determinado la dosis diagnóstica y el tiempo de diagnóstico para una especie de una región dada, estos parámetros serán utilizados para realizar pruebas con la población de vectores de esa región particular, desde ese momento en adelante. El uso de los mismos parámetros de referencia se requiere para detectar cambios en la respuesta al insecticida de la población de vectores con el paso del tiempo (Ej., número de mosquitos de prueba que sobrevive después del tiempo de exposición que originalmente mató al 100% de la población experimental). En el Apéndice 2 se provee información detallada acerca de las dosis diagnósticas, tiempos de diagnóstico y calibración del ensayo biológico de la botella de los CDC.

Las dosis diagnósticas y tiempos de diagnóstico han sido determinados para mosquitos de muchas regiones geográficas. La Tabla 1 muestra las dosis diagnósticas y tiempos de diagnóstico aplicables a las especies de mosquitos *Anopheles* y *Aedes*. Las dosis diagnósticas y tiempos de diagnóstico para *Anopheles* que se muestran abajo son las acordadas para el uso en *Anopheles* de Sudamérica como parte de la Iniciativa Amazónica contra la Malaria (AMI). Las dosis y tiempos de diagnósticos para *Anopheles* y *Aedes*, están dentro del rango de dosis y tiempos de diagnósticos establecidos para ser usados en todo el mundo. Por consiguiente, las dosis diagnósticas y tiempos de diagnóstico de la Tabla 1 sirven como

Insecticida	Concentración de insecticida por especie (µg/botella)		Tiempo de diagnóstico (minutos)
	<i>Anopheles</i>	<i>Aedes</i>	
Bendiocarb	12,5	12,5	30
Ciflutrina	12,5	10	30
Cipermetrina	12,5	10	30
DDT	100	75	45
Deltametrina	12,5	10	30
Fenitrothion	50	50	30
Lambdacyhalotrina	12,5	10	30
Malation	50	50	30
Permetrina	21,5	15	30
Pirimifos-metil	20	—	30

valores de referencia para los principales insecticidas usados a nivel mundial. Las dosis diagnósticas y tiempos de diagnóstico para otras especies de insectos deben aún ser determinadas. En resumen, la determinación de la dosis diagnóstica y el tiempo de diagnóstico es el primer paso para estandarizar el ensayo biológico de la botella de los CDC. Para permitir la comparación de resultados entre laboratorios localizados en diferentes regiones, la determinación de la dosis diagnóstica y tiempo de diagnóstico debería realizarse con un criterio homogéneo a nivel nacional o regional. Una vez que la dosis diagnóstica y el tiempo de diagnóstico hayan sido determinados para un insecticida y especie de mosquito en particular, no es necesario repetir este proceso hasta que se documente evidencia de altos niveles de resistencia en la especie de mosquitos de esta región.

3.2. Preparación de soluciones stock

Las botellas destinadas para el ensayo biológico deben ser recubiertas en su interior con la dosis diagnóstica del insecticida a evaluar. Como se ve en la Tabla 1, la dosis diagnóstica es una cantidad determinada de insecticida por botella. De esta manera, si 12,5 µg de deltametrina deben ser añadidos a una botella prueba, se aconseja tener una solución stock de concentración 12,5 µg/ml, lo cual significa que 1 ml de la solución stock contendría la cantidad necesaria de insecticida que debe ser añadida a cada botella. Por consiguiente y por practicidad, se aconseja la preparación de soluciones stock con las mismas concentraciones de insecticida que las requeridas para recubrir las botellas.

Para preparar las soluciones stock de insecticidas, diluya la cantidad apropiada de insecticida (sea producto de grado técnico [puro] o de formulación) en acetona o etanol de grado técnico (puro). En la Tabla 2 se ejemplifican cantidades de insecticida de grado técnico necesarias para preparar 100 ml, 500 ml y 1000 ml de soluciones stock. El insecticida de grado técnico puede ser sólido o líquido y hay que tener en cuenta que este debe ser de buena calidad y no caducados. Es importante etiquetar la botella de solución stock con el nombre del insecticida, su concentración y la fecha de preparación. En el Recuadro 1, se presentan ejemplos de preparación de soluciones stock a partir de insecticidas de grado técnico y de formulación. La solución stock preparada puede ser almacenada en el refrigerador (4°C) en botellas a prueba de luz (botellas de color ámbar o envueltas en papel de aluminio si son transparentes) hasta el momento de ser usadas. En los CDC, se han usado soluciones stock de numerosos insecticidas mantenidas refrigeradas durante 2 a 3 años sin que se haya observado

Insecticida	Peso (mg) de insecticida de grado técnico requerido por volumen de solución stock (<i>Anopheles</i>)			Peso (mg) de insecticida de grado técnico requerido por volumen de solución stock (<i>Aedes</i>)		
	100 ml	500 ml	1000 ml	100 ml	500 ml	1000 ml
Bendiocarb	1,25	6,25	12,5	1,25	6,25	12,5
Ciflutrina	1,25	6,25	12,5	1	5	10
Cipermetrina	1,25	6,25	12,5	1	5	10
DDT	10	50	100	7,5	37,5	75
Deltametrina	1,25	6,25	12,5	1	5	10
Fenitrotion	5	25	50	5	25	50
Lambdacyhalotrina	1,25	6,25	12,5	1	5	10
Malation	5	25	50	5	25	50
Permetrina	2,15	10,75	21,5	1,5	7,5	15
Pirimifos-metil	2	10	20	—	—	—

degradación de la actividad. Es recomendable que las soluciones stock se saquen del refrigerador por lo menos una hora antes de realizar el ensayo biológico para que alcancen la temperatura ambiente antes de ser usados. La solución stock debe ser agitada suavemente antes de usarse para homogeneizarla.

Recuadro 1: Ejemplos de preparación de solución stock.

1. Preparación de soluciones stock a partir de insecticida de calidad técnica

Asumiendo que se parte de deltametrina 100% de grado técnico (puro), por ejemplo, y con el objetivo de obtener una concentración de 12,5 µg/botella, disuelva 12,5 mg de insecticida en suficiente acetona o etanol absoluto para obtener 1 litro de solución total. De esta manera, cada 1 ml de esta solución contendrá 12,5 µg del insecticida. El volumen de las soluciones stock puede ser variable (Ej., 100 ml) de acuerdo a la conveniencia del usuario, siempre y cuando no se modifique la proporción de insecticida y el solvente.

2. Preparación de soluciones stock a partir de formulaciones que no son de grado técnico

Considere la concentración del ingrediente activo en la formulación de partida para luego calcular el volumen de formulación a ser agregado al solvente, y así obtener la concentración deseada en una solución stock. Para ello, simplemente divida la cantidad de miligramos necesaria para 1 litro de solución stock por la concentración del ingrediente activo en la formulación disponible. Esto dará el volumen de formulación que debe ser utilizado para hacer 1 litro de solución stock. Fórmula:

$$\frac{\text{Miligramos de grado técnico}}{\% \text{ de ingredientes activos en la formulación}}$$

Ejemplo:

Usando una formulación del deltametrina 10%, calcule cuánto volumen de la solución de origen se necesita para obtener 12,5 mg del insecticida.

$$\text{Volumen necesario} = \frac{12,5 \text{ mg}}{0,10} = 125 \text{ mg de la formulación a } 10\%$$

Entonces se debe agregar 125 mg de una formulación de deltametrina 10% agregadas a suficiente acetona o etanol absoluto para obtener 1 litro de solución stock, y de esta manera, cada 1 ml de solución estándar contendrá 12,5 µg de deltametrina.

3.3. Manipulación de mosquitos

Los mosquitos hembra que serán usados en el ensayo biológico pueden ser capturados en campo como adultos (siendo de edad y estado fisiológico variado) o pueden ser adultos de edad conocida obtenidos en laboratorio a partir de larvas de campo. No se recomienda el uso de mosquitos obtenidos de huevos ovipuestos en el insectario para este ensayo. Si se usan hembras adultas de campo, se debe registrar en la hoja de resultados su estado fisiológico (Ej., no alimentada, alimentada con sangre, fecundada). Los mosquitos hembra deben ser alimentados sólo con solución azucarada (10%) el día antes de la prueba. Se recomienda un mínimo de 100 mosquitos, divididos en cuatro botellas prueba para realizar la prueba de un insecticida a una concentración dada. Cuando no sea posible disponer de tal número de mosquitos en una misma ocasión, se pueden combinar los resultados de múltiples ensayos biológicos

de días diferentes para lograr el tamaño de muestra recomendada de 100 mosquitos. En cualquier caso, cada ensayo biológico debe incluir una botella control (sin insecticida) con 10–25 mosquitos.

Algunas colecciones de campo pueden contener especies diferentes. Por consiguiente, se debe realizar una identificación taxonómica de especies ya sea antes o después de realizar el ensayo biológico para validar los resultados (Recuadro 2). Para determinar la composición de especies de colecciones de mosquitos antes del ensayo biológico, los mosquitos pueden ser adormecidos con acetato de etilo.

Recuadro 2: Instrucciones para situaciones donde hay diferentes especies de mosquito en una muestra.

En situaciones donde existen diferentes especies de mosquitos en una muestra, se recomienda que las especies sean identificadas, ya sea antes o después del ensayo biológico de la botella de los CDC. Si se detecta una especie predominante (Ej., más del 95% pertenecen a una misma especie), considere esta como la especie sometida a prueba, y los resultados del ensayo biológico de la botella de los CDC serían adecuados para la especie predominante.

Si no hubiese una especie en particular que represente por lo menos el 95% de los mosquitos de la muestra que está siendo sometida a la pruebas, ajuste los resultados a esta población heterogénea. Para lograr esto:

1. Identifique las especies y sepárelas antes del ensayo biológico usando acetato de etilo para adormecerlas. Realice ensayos biológicos independientes para cada especie, o uno solo si existe una especie predominante y de interés; o
2. Inicie el ensayo biológico sin identificación previa si esta no fuese posible (por falta de experiencia en el “adormecimiento” de mosquitos o por la presencia de especies estrechamente relacionadas o crípticas). Si hubiese mosquitos sobrevivientes luego del tiempo de diagnóstico, interrumpa el ensayo y separe los mosquitos vivos de los muertos. Identifique las especies de ambos (vivos y muertos), y considérelas separadamente para el análisis.

3.4. Limpieza y secado de botellas antes del recubrimiento

- a) Lave las botellas con agua jabonosa caliente y enjuague a fondo con agua por lo menos tres veces. Para este paso puede usar agua corriente;
- b) Coloque las botellas en horno (estufa) (50°C) por 15–20 minutos o hasta que estén completamente secas;
- c) Si no hubiese horno, deje las botellas destapadas hasta que se sequen completamente a temperatura ambiente o bajo el sol. En ambientes húmedos, las botellas destapadas se pueden dejar secar durante la noche o por el tiempo que sea necesario;
- d) Para asegurar un procedimiento adecuado de limpieza, introduzca algunos mosquitos susceptibles en una muestra de botellas recientemente lavadas y secadas. Los mosquitos no deberían morir de inmediato. Pero en caso de que esto ocurriese, repita el procedimiento de lavado y secado y realice una nueva prueba con mosquitos.

3.5. Rotulado de botellas

- a) Dado que las botellas serán usadas nuevamente, considere el uso de cinta adhesiva para rotular botellas y tapas en lugar de escribir directamente en ellas (Figura 2). Esto facilitará la limpieza de las botellas al finalizar el ensayo biológico;
- b) Marque una botella y su tapa como control;
- c) Marque las otras cuatro botellas y sus tapas con el número de muestra (1 a 4) y la fecha del ensayo biológico;
- d) Si se evalúa simultáneamente más de un tipo de insecticida o más de una concentración, incluya en las etiquetas de las botellas y sus tapas la concentración y el nombre del insecticida que contienen;
- e) Recuerde siempre rotular la botella y su tapa, de manera que cada botella sea asociada con su tapa respectiva. Esto es de vital importancia porque el interior de la botella entera estará recubierto, incluyendo el interior de la tapa.



Figura 2: Rotulado de botellas y tapas.

3.6. Recubrimiento de botellas

- a) Asegúrese que las botellas y las tapas estén completamente secas;
- b) Destape las botellas;
- c) Si se usan pipetas desechables, etiquete una pipeta con “diluyente” para la botella control, y otra pipeta con “solución insecticida” para las botellas prueba;
- d) Agregue 1ml de acetona/etanol a la botella control y tápela firmemente;
- e) Agregue a la primera botella de prueba el volumen necesario de solución stock de insecticida para obtener la dosis diagnóstica deseada (Tabla 1). Si se preparó la solución stock según lo sugerido, de manera que la solución stock tenga la misma concentración de insecticida por ml que la dosis diagnóstica, entonces se debe agregar 1ml de solución stock a la botella. Tape firmemente la botella.
- f) Repita el Paso e con las otras tres botellas experimentales;
- g) Agite suavemente el contenido dentro de la botella de manera que el fondo sea recubierto (Figura 3);
- h) Invierta la botella y agite para recubrir el interior de la tapa (Figura 4);
- i) Coloque la botella de lado por un momento y deje que el contenido se distribuya. Rote la botella suavemente a fin de que todas las paredes de la misma sean recubiertas (Figura 5);



Figura 3: Recubriendo el fondo de la botella.



Figura 4: Recubriendo la parte superior de la botella (y tapa)



Figura 5: Recubriendo los lados de la botella.



Figura 6: Quitando las tapas y rotando las botellas.

- j) Repita el paso anterior para todas las botellas prueba;
- k) Quite las tapas y continúe rotando las botellas sobre sus lados hasta que todas las señales visibles de líquido hayan desaparecido y las botellas estén completamente secas (Figura 6);
- l) Deje las botellas sobre sus lados y cúbralas con algo que las mantenga protegidas de la luz;
- m) Si las botellas no se van a usar de inmediato, almacénelas en un lugar oscuro (como una gaveta), sin sus tapas para evitar la humedad. Si hubiese que enviar botellas recubiertas con insecticidas de un laboratorio a otro o del laboratorio al campo, envíelas con las tapas puestas. En la Sección 4.3 podrá encontrar más información sobre almacenamiento de botellas recubiertas.

4. Método del ensayo biológico de la botella de los CDC

4.1. Consideraciones generales

- a) Utilice un filtro en el aspirador para evitar aspirar mosquitos o fragmentos de insectos;
- b) Para introducir los mosquitos dentro de las botellas, sople muy suavemente. Si se sopla demasiado fuerte, los mosquitos pueden golpearse contra las paredes de la botella y morir antes de que el insecticida tenga efecto en ellos;
- c) Tenga cuidado de no tocar el interior de la botella con el aspirador, ya que se podría contaminar el aspirador;
- d) Recuerde que el número de mosquitos en cada una de las botellas prueba no tiene que ser igual;
- e) Determine la composición de especies de mosquitos de la muestra ya sea antes o después de realizar el ensayo biológico (Recuadro 2).

4.2. Ensayo biológico

El ensayo biológico se puede realizar con las botellas paradas o acostadas. Lo importante es seguir siempre el mismo procedimiento.

Procedimiento:

- a) Usando un aspirador, introduzca entre 10 y 25 mosquitos en la botella control. No es necesario contar los mosquitos ya que el número exacto no tiene importancia;
- b) Introduzca entre 10 y 25 mosquitos en cada una de las botellas prueba; nuevamente, el número exacto no tiene importancia (Figura 7);
- c) Active un cronómetro. Es necesario examinar las botellas en el Tiempo 0 y contar el número de mosquitos muertos y/o vivos;



Figura 7: Transfiriendo mosquitos a las botellas recubiertas con insecticida.



Figura 8: Ensayo biológico de la botella de los CDC en marcha.

- d) Los mosquitos muertos en el Tiempo 0 deben ser contados y registrados en el formulario de reporte (Apéndice 3);
- e) Registre cuántos mosquitos están vivos o cuántos han muerto (lo que sea más fácil de contar), cada 15 minutos hasta que la totalidad de mosquitos haya muerto, o hasta que se cumplan 2 horas desde el inicio (Figura 8). No es necesario continuar con el ensayo biológico luego de 2 horas;
- f) Registre todos los datos de mortalidad en el formulario de reporte (Apéndice 3);
- g) Grafique el porcentaje total de mortalidad, considerando los datos de las cuatro botellas prueba juntas (Eje Y) en función del tiempo (Eje X);
- h) Recuerde que la mortalidad en el tiempo de diagnóstico es el valor más crítico ya que representa el límite entre la susceptibilidad y la resistencia. Refiérase a la Tabla 1 para los tiempos de diagnóstico de las dosis diagnósticas para los insecticidas comúnmente usados en los ensayos;
- i) Tome en consideración la mortalidad en la botella control en 2 horas (el final del ensayo biológico) al informar sobre los resultados del ensayo biológico (Sección 4.5). Use la fórmula de Abbott para corregir resultados si la mortalidad en 2 horas en la botella control es entre el 3% y 10%. Si la mortalidad en la botella control al final de la prueba fuese >10%, los resultados del ensayo biológico deberían quizás ser descartados;

Los mosquitos son considerados ‘muertos’ si no pueden mantenerse de pie. Para más información vea el Recuadro 3.

Se podría activar un cronómetro para cada botella, pero en realidad, es suficiente activar un cronómetro luego de introducir los mosquitos en la primera o la última botella. Lo importante es ser consistente y seguir siempre el mismo procedimiento de activación del cronómetro. Los mosquitos vivos al tiempo de diagnóstico (Tabla 1) se considerarán mosquitos resistentes al insecticida evaluado. Estos mosquitos pueden ser transferidos a un recipiente acondicionado para manipulación de mosquitos (caja con aperturas para las manos y brazos recubiertas con tejido) para análisis posteriores (Ej., ensayos moleculares o bioquímicos). Los mosquitos que vuelen al finalizar el ensayo biológico en la botella control, quizá deban matarse para ser contados precisamente. Se puede matar mosquitos por congelamiento o aturdiéndolos.

Recuadro 3: Notas sobre criterio de mortalidad.

- Mosquitos “muertos” son los que no se pueden mantener de pie.
- Rotar suavemente la botella facilita el conteo.
- Mosquitos inmovilizados que se deslizan por la curvatura de la botella al rotarla deben ser clasificados como muertos.
- Es más fácil contar el número de mosquitos muertos en las primeras lecturas del ensayo biológico, y contar el número de mosquitos vivos en mediciones posteriores, cuando muy pocos permanecen vivos.
- El porcentaje de mosquitos muertos en el tiempo diagnóstico (mosquitos muertos/total de mosquitos en el ensayo) es el valor más importante en el gráfico.

4.3. Manipulación de botellas recubiertas

En una misma botella se puede evaluar más de un grupo de mosquitos en un mismo día. Sin embargo, el principal factor limitante para usar repetidamente las botellas recubiertas es la humedad que podría acumularse dentro de ellas con las sucesivas introducciones de mosquitos, especialmente si se trabaja en condiciones húmedas. Si las botellas van a ser usadas nuevamente el mismo día, es recomendable dejar transcurrir un tiempo entre ensayos biológicos (2–4 horas, o más tiempo si las condiciones son muy húmedas), para permitir que las botellas se sequen (destapadas) antes de introducir más mosquitos. Si las botellas serán usadas nuevamente al día siguiente, se pueden dejar secar las botellas destapadas durante la noche evitando el contacto con luz directa. **Está prohibido secar las botellas después de haber sido recubiertas con insecticida en el horno.**

Si las botellas no se van a usar inmediatamente después de ser recubiertas con el insecticida, es posible guardarlas para su uso posterior. Cuando las botellas estén secas, deben guardarse destapadas en un lugar oscuro (como una gaveta). El tiempo que las botellas pueden guardarse depende del insecticida usado, y puede variar de 12 horas a 5 días. Las botellas recubiertas con resmetrina o naled deben ser usadas inmediatamente después de prepararse ya que no mantienen buenas condiciones al ser almacenadas. Las botellas recubiertas con insecticidas organofosforados deben ser usadas el mismo día o máximo a las 24 horas de preparadas. Para saber si una botella que fue almacenada es todavía adecuada para hacer pruebas, se puede hacer una evaluación de la misma con mosquitos susceptibles. Si los mosquitos mueren en el límite de tiempo esperado (dentro del tiempo de diagnóstico), la botella puede ser usada. Las botellas pueden ser recubiertas con insecticida en un laboratorio central y enviadas para su uso en el campo. Durante el transporte, las botellas deben estar tapadas.

4.4. Identificación de mecanismos de resistencia

Se supone que existe resistencia si una proporción de la población experimental sobrevive a la dosis diagnóstica en el tiempo de diagnóstico. Los mosquitos que sobreviven al ensayo biológico pueden servir para pruebas de identificación de mecanismos de resistencia mediante pruebas enzimáticas o métodos moleculares. Los mosquitos sobrevivientes pueden ser fácilmente transferidos de las botellas a un recipiente acondicionado para separarlos de los muertos durante el ensayo biológico de la botella de los CDC. Los mosquitos que serán sometidos luego a pruebas enzimáticas deben ser congelados (-20°C). Los mosquitos que serán usados para estudios moleculares pueden ser congelados, secados o conservados en etanol 70% (o de mayor porcentaje). Quizá sea necesario usar productos como RNALater® (Applied Biosystems [Ambion], Foster City, California) para conservar los mosquitos que se usarán en pruebas moleculares para medir los niveles de RNA asociados a los mecanismos enzimáticos de regulación por incremento, o de sobre regulación (up-regulated).

4.5. Validez de los resultados

Al adquirir práctica, la mortalidad de mosquitos en la botella control luego de 2 horas (al final del ensayo biológico) debe ser cero. En la mayoría de los casos, la mortalidad de hasta un 3% en la botella control puede ser ignorada. En los casos donde la mortalidad en la botella control luego de las 2 horas del ensayo sea del 3% al 10%, es posible usar la fórmula de Abbott para corregir las conclusiones (Recuadro 4), o los resultados pueden ser descartados y debe repetirse el ensayo biológico. Si la mortalidad en la botella control es mayor al 10% al final del ensayo biológico, los resultados de esta prueba en particular deben ser descartados y el ensayo debe repetirse. Si un grupo de mosquitos en particular es esencialmente irremplazable y el ensayo biológico no puede ser repetido, la fórmula de Abbott puede ser considerada aún cuando la mortalidad de control sea $>10\%$.

Recuadro 4: Fórmula de Abbott.

$$\text{Mortalidad corregida} = \frac{(\text{mortalidad en botellas prueba [\%]} - \text{mortalidad en botella control [\%]}) \times 100}{(100\% - \text{mortalidad en botella control [\%]})}$$

Por ejemplo: Si la mortalidad en las botellas prueba es del 50% en el tiempo de diagnóstico y la mortalidad en el control es del 10% en 2 horas, la mortalidad corregida es $[(50\% - 10\%) / (100\% - 10\%)] \times 100 = 44.4\%$

Nota: En casos del 100% de mortalidad en botellas prueba, la fórmula de Abbott no tiene efecto. Por ejemplo: $[(100\% - 10\%) / (100\% - 10\%)] \times 100 = 100\%$ mortalidad corregida.

4.6. Interpretación de los resultados

Al igual que con otros ensayos biológicos de resistencia, los datos del ensayo biológico de la botella de los CDC necesitan ser comparados con datos de mosquitos susceptibles o de una población que servirá como referencia. Los límites de resistencia para cada insecticida pueden ser determinados calibrando el ensayo biológico de la botella de los CDC (Apéndice 2). La calibración consiste en determinar la dosis diagnóstica y el tiempo de diagnóstico para una especie en particular de una región dada, lo cual corresponde a la dosis y el tiempo al cual la totalidad de mosquitos susceptibles mueren (Figura 9). Si los mosquitos experimentales sobreviven más allá de este límite, estos sobrevivientes representan una proporción de la población que tiene algo que hace que el insecticida se demore en alcanzar su sitio blanco y actúe en él. En otras palabras, poseen algún grado de resistencia. En el ejemplo mostrado en la Figura 9, todos los mosquitos que murieron antes del tiempo de diagnóstico al ser expuestos a las botellas recubiertas de insecticida fueron susceptibles. Se asume que los mosquitos de prueba que sobrevivieron más allá del límite del tiempo de diagnóstico tenían algún grado de resistencia. En el ejemplo, sólo 23 % de la población experimental fue sensible. Las recomendaciones para la interpretación de los resultados del ensayo biológico se muestran en el Recuadro 5. La información más importante es la mortalidad en el tiempo de diagnóstico, pero el ensayo biológico es llevado a cabo más allá del tiempo de diagnóstico para evaluar la intensidad de la resistencia en la población.

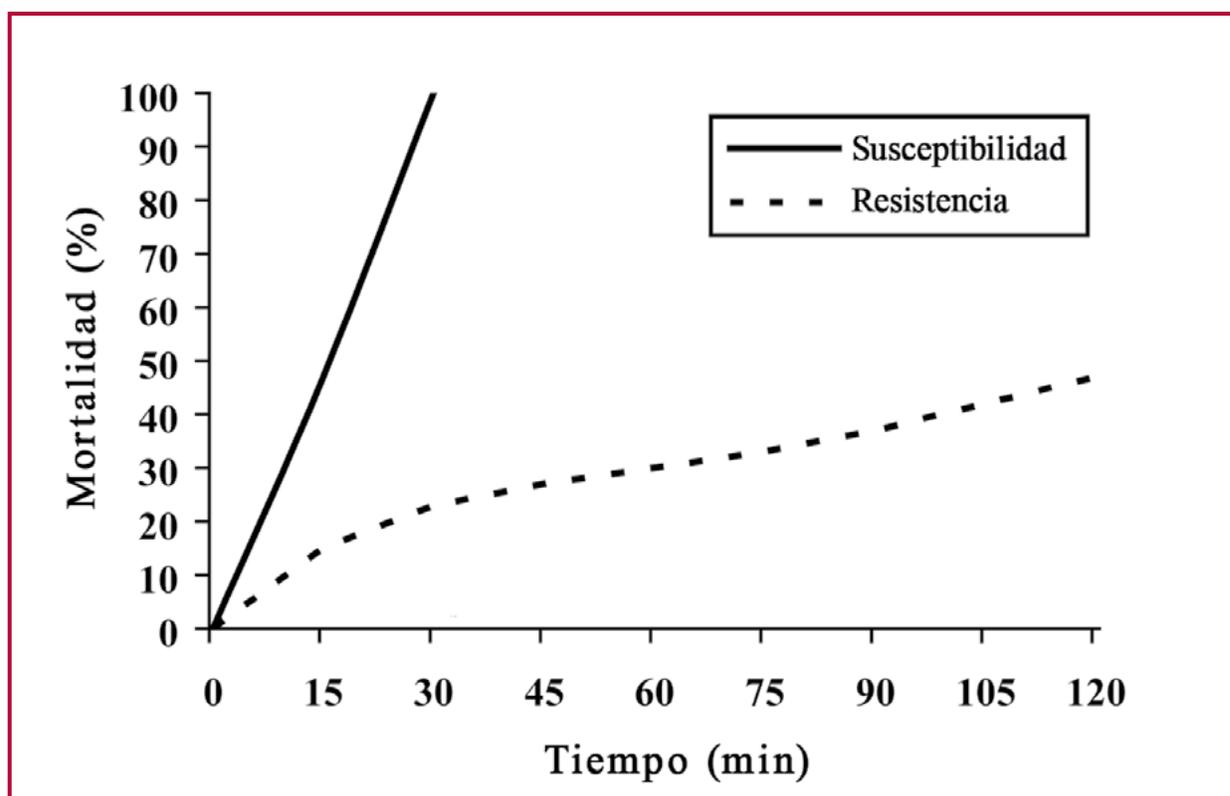


Figura 9: Determinación de límites de resistencia.

Recuadro 5: Interpretación de resultados en relación con estrategias de control.

El criterio propuesto por la Organización Mundial para la Salud (OMS) para evaluar el significado de los valores de resistencia detectados es:

- 98%–100% mortalidad en el tiempo de diagnóstico recomendado, indica susceptibilidad en la población;
- 80%–97% mortalidad en el tiempo de diagnóstico recomendado sugiere la posibilidad de resistencia y debe ser confirmada;
- <80% mortalidad en el tiempo de diagnóstico recomendado sugiere resistencia.

Nota: Los casos donde se detectó una mortalidad <95% en el tiempo de diagnóstico, en ensayos biológicos que han sido conducidos en condiciones óptimas y con un tamaño de muestra de >100 mosquitos, sugerirían fuertemente la presencia de resistencia.

5. Vigilancia epidemiológica de la resistencia

5.1. Antecedentes

A pesar de que se recojan datos de resistencia como parte de los programas de control de vectores, esto no se hace tan regularmente como debería ocurrir en un esfuerzo verdadero de vigilancia de la resistencia. La vigilancia requiere que la colección e interpretación de dichos datos sea regular para respaldar posibles cambios en los programas de salud pública. Es importante considerar al ensayo biológico de la botella de los CDC como un instrumento para obtener información como parte de un sistema de vigilancia de resistencia a un determinado insecticida, que por lo tanto debería estar involucrado dentro de un programa global de vigilancia. Los datos de resistencia son más valiosos cuando son obtenidos a través del tiempo para realizar comparaciones y monitorear tendencias.

Es importante considerar cómo será usada la información obtenida como parte de un sistema de vigilancia de la resistencia a un insecticida. La mayoría de los programas de control de malaria evalúan la eficacia de su programa de control de vectores a través de diferentes estrategias, por ejemplo, analizando la incidencia de casos de malaria o contando el número de mosquitos adultos y larvas recogidos en sitios centinela. Es necesario integrar los datos de monitoreo de la resistencia a insecticidas a otros tipos de información antes de ofrecer e implementar cambios en las estrategias de control vectorial.

5.2. Características del surgimiento de resistencia

Varios factores genéticos, biológicos y operacionales influyen en el desarrollo de resistencia a insecticidas en una población de mosquitos. En muchos casos, la resistencia es un problema complejo, con diferentes posibles escenarios resultantes en un área en particular, dependiendo de la influencia de diversos factores y de las condiciones iniciales. Aun así, existen ciertos factores generales que afectan el desarrollo de la resistencia globalmente. Se discuten a continuación las características principales de la resistencia, considerando además que cada manifestación de resistencia es potencialmente única, por lo que deben ser evaluadas individualmente.

5.3. Naturaleza focal de resistencia

Frecuentemente, el personal de control de vectores supone que la resistencia en una especie en particular ocurre en todas partes de su área de control, pero la resistencia al insecticida puede ser focal. En Guatemala, sitios centinela de *Anopheles albimanus* a sólo unos pocos kilómetros de distancia variaron en no sólo la presencia o ausencia de resistencia, sino también en los niveles de resistencia detectados y en los mecanismos dominantes de la misma. En términos generales, áreas con actividades de control de vectores en desarrollo tienden a presentar niveles más altos de resistencia.

5.4. Resistencia y control de enfermedades

En algunos casos, las estrategias de control de vectores en un área dada no se verán afectadas por el nivel de resistencia a insecticidas detectado. Por ejemplo, si un programa de control fuese capaz de controlar sólo el 75% de la población de vectores, un nivel de resistencia a un insecticida menor al 10% probablemente no afectaría los esfuerzos de control ya implementados. En tal situación, sería suficiente aumentar el número de evaluaciones entomológicas y monitorear el nivel la resistencia más a menudo, pero no sería necesario realizar cambio alguno en las estrategias de control.

5.5. Orientaciones generales

En términos generales, debe realizarse vigilancia de resistencia en áreas donde la transmisión de enfermedades por insectos vectores es una preocupación y donde son contempladas medidas de control basadas en aplicación de insecticidas, idealmente antes de la compra del insecticida. Además de las restricciones impuestas por los recursos económicos, el número de sitios que pueden ser evaluados depende altamente del tamaño del área contemplada para la aplicación del insecticida. Debido a la potencial naturaleza focal de resistencia, los esfuerzos deberían estar dirigidos a escoger sitios centinela distribuidos en el espacio dentro del área de interés. Como regla general, no se debería asumir que áreas separadas por 20 km o más tengan patrones similares de resistencia. Otra manera para escoger los sitios centinelas es focalizar la atención en las áreas de transmisión activa de enfermedades. Aun si sólo uno o unos pocos sitios pueden ser monitoreados, eso es preferible a no tener sitios centinela en esa región. Por otro lado, los esfuerzos deben dirigirse a seguir los sitios por lo menos por algunos años, ya que los datos comparativos entre fechas de evaluación proveen la información más significativa.

Idealmente, cada sitio debería ser monitoreado una vez al año. En las zonas donde los esfuerzos de control son estacionales, sería importante realizar una prueba al comienzo y al final de la estación de aplicación de medidas de control. Esto no aplica en situaciones como el uso de mosquiteros tratados con insecticida, donde la exposición al insecticida es todo el año. Si las especies de vectores de un área son estacionales, los períodos para realizar las pruebas de resistencia deben ser ajustados a las especies de interés.

Es también importante considerar que una vez detectada la resistencia con el ensayo biológico de la botella de los CDC, será necesario intentar identificar los mecanismos de resistencia, ya sea usando el ensayo biológico de la botella de los CDC con sinergistas o con métodos bioquímicos y/o moleculares. Las decisiones acerca de con cuáles insecticidas se reemplazarán los actualmente usados, dependerá del mecanismo específico de resistencia detectado en los mosquitos.

Finalmente, algunos países han encontrado útil la centralización de la preparación de botellas recubiertas con insecticida y de la organización administrativa de la vigilancia. Un laboratorio central de referencia puede proveer asistencia técnica y monitorear la calidad en la ejecución de las pruebas. También puede servir como un laboratorio de referencia para entrenamiento, provisión de suministros, identificación de especies y realización de pruebas enzimáticas y/o métodos moleculares para la determinación de mecanismos de resistencia.

6. Ensayo biológico de la botella de los CDC con sinergistas

6.1. Antecedentes

El ensayo biológico de la botella de los CDC usando botellas que fueron recubiertas con un solo insecticida brinda información acerca de la resistencia a ese insecticida en particular en la población de vectores adultos. Los resultados obtenidos pueden brindar evidencia temprana de que un insecticida está perdiendo su efectividad en una población.

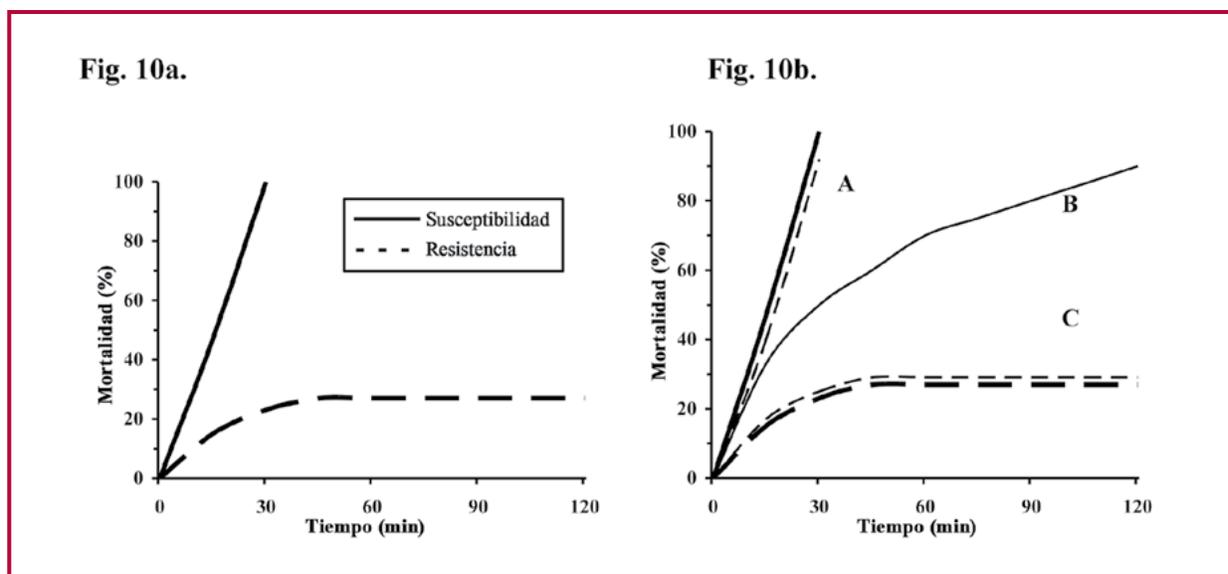
Una vez que se detecta resistencia, o al menos se sospecha que existe, en una población, se debe decidir qué hacer de ese momento en adelante, y evaluar qué otros compuestos podrían ser todavía efectivos y no están comprometidos por resistencia cruzada. Esto requiere conocimiento del mecanismo de resistencia presente en cada caso, información adquirida usualmente usando pruebas bioquímicas (micro placa) o métodos moleculares. Una alternativa rápida y barata para evaluar mecanismos de resistencia es usar el ensayo biológico de la botella de los CDC con sinergistas. Sinergistas son compuestos inhibidores de

enzimas de detoxificación de insecticidas. Existen sinergistas que actúan contra esterasas, oxidasas y glutatión s-transferasas.

Los sinergistas actúan anulando la resistencia observada en el ensayo biológico de la botella de los CDC, en caso de que una enzima de detoxificación tenga un papel en ese mecanismo de resistencia en particular (Figuras 10a y 10b). Un ejemplo de las curvas para poblaciones resistentes y susceptibles se muestra en la Figura 10a. Al usar un sinergista en la población resistente, se puede presentar una de las siguientes tres situaciones (Figura 10b):

- La resistencia al insecticida es anulada (línea A de tiempo de mortalidad), lo cual sugiere que el mecanismo relacionado con ese sinergista tiene un papel en la resistencia al insecticida observada;
- La resistencia al insecticida es anulada parcialmente (línea B de tiempo de mortalidad). Esto sugiere que el mecanismo relacionado con ese sinergista está involucrado en la resistencia, pero no es el único mecanismo involucrado;
- La resistencia al insecticida no se ve afectada (línea C de tiempo de mortalidad), lo cual indica que el mecanismo relacionado con ese sinergista no está involucrado en la resistencia.

También es posible determinar si hay un mecanismo de resistencia con sitio de acción específico (sitio target), como la presencia del gen *kdr* (mutación del canal de sodio) o acetilcolinesterasa insensible. Esto puede realizarse usando los sinergistas en combinación. Su uso combinado no anula la resistencia en los ensayos biológicos cuando un mecanismo de este tipo esté presente. En áreas donde se usan piretroides y/o DDT, evaluar el papel relativo de los mecanismos de detoxificación y los mecanismos con sitio de acción específico involucrados en la resistencia es crucial. Un mecanismo del sitio de acción específico confiere resistencia cruzada entre DDT y piretroides, mientras que un mecanismo de detoxificación puede o no hacerlo. El conocimiento del mecanismo de resistencia involucrado es indispensable para elegir el insecticida de reemplazo.



Figuras 10a y 10b. Efectos de sinergistas en poblaciones de vectores resistentes. La Figura 10a muestra el patrón de mortalidad de una población de vectores resistentes comparado con una población susceptible. La Figura 10b muestra los tres resultados posibles con la exposición al sinergista (Línea A — Resistencia al insecticida anulada; Línea B — Resistencia al insecticida anulada parcialmente; y Línea C — Resistencia al insecticida no afectada).

6.2. Utilización de sinergistas

Sinergistas comúnmente usados en el ensayo biológico de la botella de los CDC:

- Butóxido de Piperonilo (PBO), el cual inhibe la actividad de las oxidasas;
- S.S.S-tributil fosforotritioato (DEF), el cual inhibe la actividad de las esterazas;
- Etacrínico sódico (EA), maleato de dietilo (DM) y clorofenethol (CF), los cuales inhiben la actividad de la glutatión s-transferasa.

También es posible usar una combinación de los sinergistas mencionados. La prueba de mosquitos con sinergistas es un procedimiento de dos pasos. Primero, los mosquitos son expuestos al (a los) sinergista(s) por 1 hora y luego son evaluados en la prueba de resistencia al insecticida usando el ensayo biológico de la botella de los CDC. La Figura 11 muestra una representación esquemática de la realización de un ensayo biológico con sinergista(s).

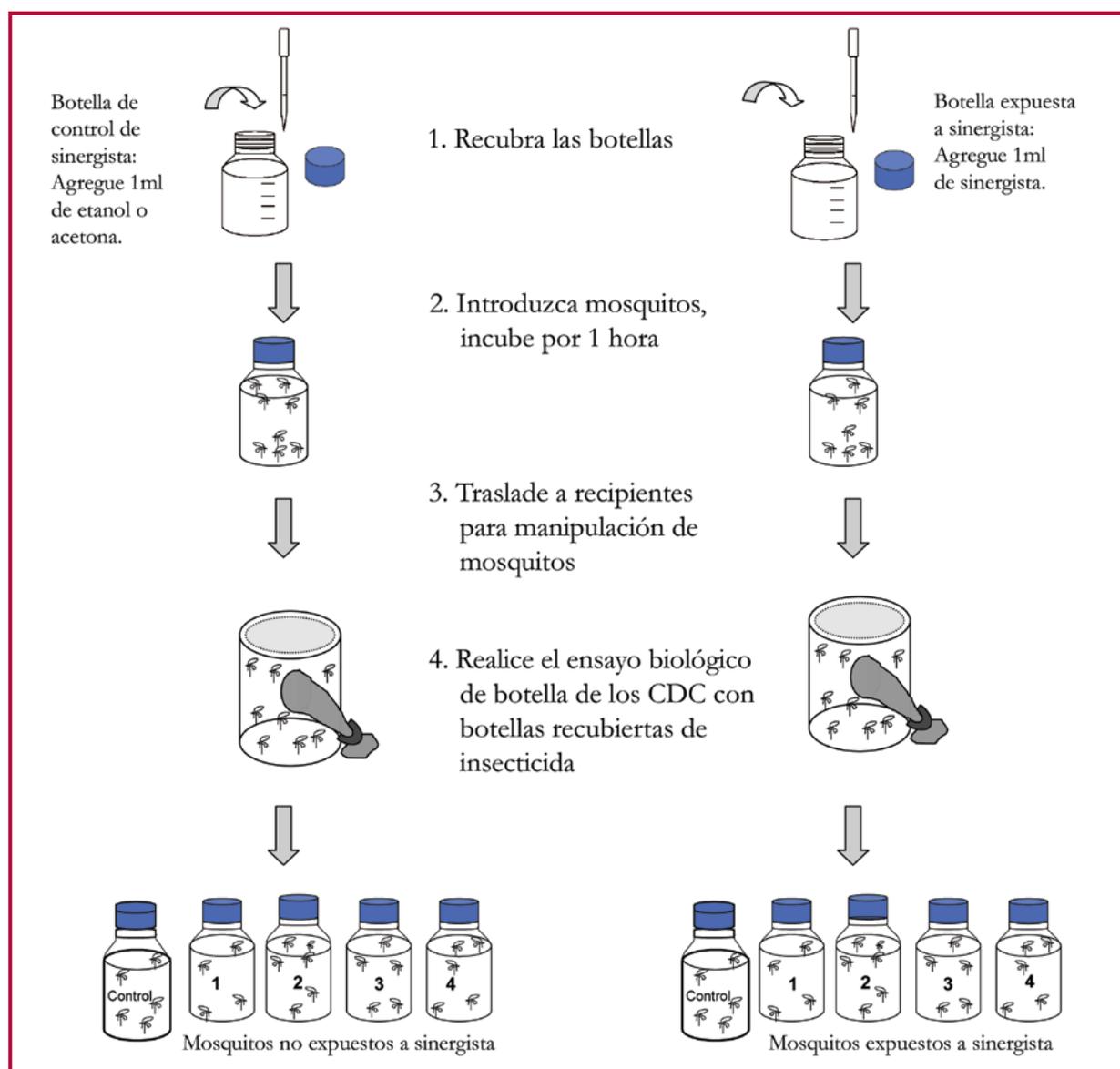


Figura 11. Ensayo biológico de la botella de los CDC con sinergistas.

6.3. Preparación de botellas para ensayos biológicos con sinergistas

Para realizar el ensayo biológico con sinergistas:

- Prepare la solución stock del sinergista diluyendo la cantidad apropiada de sinergista en acetona o etanol de grado analítico para poder recubrir las botellas con las concentraciones mostradas en la Tabla 3. Para hacer las soluciones stock, utilizar el mismo procedimiento descrito para hacer soluciones stock de insecticida (Sección 3.2). Brevemente, diluya la cantidad apropiada de sinergista en acetona o etanol de grado analítico. Por ejemplo, para obtener una concentración de 400 µg/botella de butóxido de piperonilo, diluya 400 mg en suficiente acetona o etanol absoluto para obtener 1 litro de solución. Cada 1 ml de esta solución contendrá 400 µg de butóxido de piperonilo;
- Marque una botella y su tapa como la botella control de sinergista (sin sinergista);
- Rotule una segunda botella y su tapa para ser la botella de exposición al sinergista;
- Agregue 1ml de acetona o etanol a la botella control de sinergista y tápela firmemente;
- Agregue 1 ml de la solución stock de sinergista a la botella de exposición al sinergista y tápela firmemente;
- Recubra las botellas, quite las tapas y deje secar las botellas como fue explicado en la Sección 3.6;
- Prepare dos juegos de botellas para realizar el ensayo biológico de la botella de los CDC (Sección 3.6).

Tabla 3: Concentraciones de sinergista usadas en el ensayo biológico de la botella de los CDC.	
Sinergista	Concentración de sinergista (µg/botella)
Clorofenol	80
Maleato de dietilo	80
Etacrínico sódico	80
Butóxido de piperonilo	400
S.S.S-tributil fosforotritioato	125

6.4. Ensayo biológico de la botella de los CDC con sinergistas

Procedimiento:

- Introduzca igual número de mosquitos dentro de la botella control de sinergista y dentro de la botella de exposición al sinergista (aproximadamente 125 mosquitos en cada botella);
- Mantenga los mosquitos en las botellas por 1 hora para permitir que actúe el sinergista;
- Después de completar la exposición de 1 hora, transfiera los mosquitos a dos recipientes adaptados para la manipulación de mosquitos, en uno ponga los mosquitos control de sinergista y en el otro los mosquitos que fueron expuestos al sinergista. De esta manera, se facilitará la transferencia de mosquitos a las botellas tratadas con insecticida;

- d) Realice el ensayo biológico de la botella de los CDC, como fue explicado en la Sección 4.2, utilizando un juego de botellas recubiertas con insecticida (una botella control y cuatro de prueba) para los mosquitos de control de sinergista y un duplicado (una botella control y cuatro de prueba) para los mosquitos expuestos al sinergista;
- e) Compare los resultados del ensayo biológico de la botella de los CDC para los dos grupos de mosquitos analizados.

6.5. Interpretación de ensayos biológicos con sinergistas

La sección 6.1 y las Figuras 10a y 10b proveen información sobre cómo interpretar los resultados del ensayo biológico de la botella de los CDC usando sinergistas. La resistencia que no pueda ser atribuida a uno de los mecanismos de detoxificación después de que todos los sinergistas han sido usados es probable que se pueda atribuir a un mecanismo de resistencia con sitio de acción específico, como kdr (mutación de canal de sodio) o acetilcolinesterasa insensible, y consecuentemente otro tipo de pruebas (moleculares o enzimáticas) deben realizarse para determinar el mecanismo involucrado.

7. Bibliografía

1. Brogdon, WG and McAllister JC, 1998. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 14(2):159–64.
2. National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Evaluating mosquitoes for insecticide resistance: Ensino via Web. Disponible em: <http://www.cdc.gov/malaria>.
3. Zamora Perea E, Balta Leon R, Palomino Salcedo M, Brogdon W, Devine G, 2009. Adaptation and evaluation of the bottle assay for monitoring insecticide resistance in disease vector mosquitoes in the Peruvian Amazon. *Malar. J.* 8: 208.

APÉNDICES

Apéndice 1. Preguntas frecuentes

1. ¿Qué ocurriría si no hubiese suficientes mosquitos para un ensayo biológico completo?

Cuando el número de mosquitos capturados en el campo es insuficiente para un ensayo biológico completo (cuatro botellas prueba y una control), se puede reducir el número de botellas de evaluación, pero cada ensayo biológico SIEMPRE debe ser realizado con un control hasta que el número necesario de mosquitos para un ensayo completo sea obtenido. Si las pruebas se realizaran en un periodo extendido de tiempo, es recomendable usar botellas recubiertas recientemente. Siga las instrucciones para evaluar el tiempo de vida útil esperado para las botellas recubiertas. Excepto en el caso de botellas recubiertas con insecticidas organofosforados, las botellas recubiertas pueden ser usadas repetidas veces durante varios días hasta que el ensayo biológico se complete, siempre y cuando la acumulación de humedad debido a la aspiración no sea excesiva

2. ¿Deberían designarse algunas botellas solamente como botellas control?

No, algunas botellas no deben ser designadas siempre como botellas control. Las botellas deben ser asignadas al azar como botellas prueba o control. Esto proveerá un control de calidad adicional para evaluar el procedimiento de lavado.

3. ¿Qué ocurriría si no hubiese mosquitos susceptibles disponibles para la calibración del ensayo biológico de la botella de los CDC?

La dosis diagnóstica y el tiempo de diagnóstico para algunas especies en particular en un área dada son similares. Use la dosis diagnóstica y el tiempo de diagnóstico publicado en estas instrucciones o consulte a los autores de estas instrucciones u otros usuarios con experiencia en este procedimiento para recibir recomendaciones sobre ese vector en particular. Note que el valor del ensayo biológico de la botella de los CDC se basa en mostrar cambios en el paso del tiempo en las características de las poblaciones vectoriales. Por consiguiente, un punto de referencia es imprescindible aun si algunos mosquitos muestran resistencia al momento de establecer el punto de referencia inicial.

4. ¿Pueden usarse mosquitos machos para la botella control?

No, los machos no deben ser usados para las botellas control. Algunos mecanismos de resistencia están ligados al sexo, y podrían sesgar los resultados si se utilizaran machos en el control. Además, la mayoría de mosquitos colectados en campo serán hembras.

5. ¿Cómo introducir mosquitos en la botella sin permitir que otros mosquitos escapen?

Algunas personas han encontrado útil utilizar un pedazo de algodón absorbente sujetado contra el tubo de aspiración en la parte superior de la botella al momento de introducir los mosquitos en las botellas. Al retirar el aspirador, inmediatamente después que los mosquitos sean introducidos, el algodón se usa para tapar rápidamente la botella, hasta que se coloque la tapa de la misma. En nuestra experiencia, un soplo de aire contundente y rápido introducirá los mosquitos en la botella sin pérdida de los mismos. Al intentar introducir los mosquitos en una botella en más de una vez da lugar a que algunos escapen. Esto suele ocurrir si el usuario intenta introducir el número exacto de mosquitos en cada botella, lo cual no es necesario.

6. ¿Qué pasaría si hubiese mosquitos alimentados y no alimentados entre los mosquitos colectados en campo para ser usados en el ensayo biológico?

Una colección de mosquitos del campo puede contener mosquitos hembra en estados fisiológicos diversos, Ej., mosquitos alimentados o no. Hay dos formas para considerar este factor. La primera es seleccionar los mosquitos al azar para las diferentes réplicas. Alternativamente, los mosquitos se pueden mantener por uno o dos días para que el alimento (sangre) sea digerido, antes de ser usados para el ensayo biológico.

Apéndice 2. Dosis diagnóstica y calibración del ensayo biológico de la botella de los CDC

Se supone que existe resistencia si una población de insectos sobrevive a la dosis diagnóstica probada y validada previamente en una población de insectos susceptibles en el tiempo de diagnóstico predeterminado. La dosis diagnóstica y el tiempo de diagnóstico son los parámetros óptimos para detectar la resistencia a un insecticida. Una dosis diagnóstica demasiado baja no matará a los mosquitos susceptibles durante el transcurso del ensayo biológico, proporcionando un resultado “falso positivo” de resistencia. Por otra parte, una dosis diagnóstica demasiado alta matará mosquitos resistentes durante el ensayo biológico y ocultará o subestimarán la resistencia.

Para algunos insectos vectores de algunas regiones geográficas, las dosis diagnósticas y tiempos de diagnóstico para varios insecticidas ya han sido determinadas. Se recomienda que los países en estas regiones usen los parámetros ya establecidos para posibilitar comparaciones entre países o dentro de regiones. Sin embargo, si esta información no estuviese disponible, la dosis diagnóstica y el tiempo de diagnóstico necesitarán ser definidos para cada insecticida, en cada región y para cada una de las especies de vectores principales que deben ser monitoreadas. Para determinar la dosis diagnóstica y el tiempo de diagnóstico a utilizar en el ensayo biológico de la botella de los CDC, la prueba deberá ser calibrada.

Prueba de calibración

Para la calibración del ensayo biológico, es necesario seleccionar previamente la población de insectos a evaluar y los posibles tiempos de prueba, y luego determinar las posibles dosis diagnósticas y sus respectivos tiempos de diagnóstico.

Población: El primer paso es seleccionar una población de vectores susceptibles para usar como referencia. Si dicha población no estuviera disponible, se podría usar la población de vectores del área donde las medidas químicas de control de vectores deben ser aplicadas. Este será el punto de referencia contra el cual toda población futura deberá ser comparada.

Tiempo de diagnóstico: Por razones prácticas, el tiempo de diagnóstico debe estar entre 30 y 60 minutos.

Dosis diagnóstica: La dosis diagnóstica será una dosis de insecticida que puede matar el 100% de mosquitos en un lapso de entre 30 y 60 minutos y que esté por debajo del punto de saturación. Para determinar las posibles dosis diagnósticas, primero prepare las botellas con una gama de concentraciones diferentes de insecticida por botella, como se esboza en las instrucciones. Usando cada una de estas botellas, realice ensayos biológicos de la botella de los CDC con 25 mosquitos de la población sensible para determinar el límite superior de la dosis diagnóstica, el cuál es el punto de saturación. El punto de saturación puede definirse como la concentración por sobre la cual (mayores concentraciones) no causarían disminución alguna en el tiempo requerido para matar el 100% de los mosquitos. Vea explicación detallada sobre como determinar el punto de saturación abajo.

Quizá sea necesario realizar pruebas adicionales con concentraciones dentro de un dado rango hasta que la dosis diagnóstica óptima sea determinada. Por ejemplo, comience con 10 µg/botella y siga con incrementos de 5 µg/botella, hasta llegar a 200 µg/botella. Si no pudiese determinarse claramente el punto de saturación, realice más pruebas usando botellas con <10 µg/botella y/o >200 µg/botella, con incrementos de 5 µg. Si el punto de saturación aun no pudiese determinarse, pueden realizarse más pruebas usando incrementos todavía menores de concentración de insecticida.

Interpretación de los datos de calibración

Al graficar los resultados de la prueba de calibración, podrá verse que la curva de tiempo de mortalidad se volverá más recta, más pronunciada y más cercana al Eje Y al aumentar la concentración de insecticida (Figura). Esto significa que al aumentar la concentración de insecticida, la curva del tiempo de mortalidad alcanzará un punto a partir del cual aumentar la concentración de insecticida no matará el 100% de los mosquitos en menor tiempo (punto de saturación). En el ejemplo de abajo, 15 $\mu\text{g}/\text{botella}$ es el punto de saturación toxicológico para que el insecticida penetre en el mosquito y alcance su sitio blanco. Aumentar la concentración a 25 $\mu\text{g}/\text{botella}$ no hará que el insecticida penetre en el mosquito, alcance su sitio blanco y mate al mosquito más rápido. Por consiguiente, 15 $\mu\text{g}/\text{botella}$ es el punto de saturación y la concentración máxima para usar como dosis diagnóstica. De otra manera, habría riesgo de que los mosquitos resistentes mueran por dosis más altas que el punto de saturación y sean luego registrados como susceptibles, en otras palabras, ocultando o causando una subestimación de resistencia.

Una concentración ligeramente más pequeña que el punto de saturación tóxico, matará mosquitos en un tiempo quizá más convenientes para el usuario (Ej., 30 a 60 minutos). De esta manera es aconsejable escoger una dosis diagnóstica más baja que mate el 100% de mosquitos en un período de 30 a 60 min. Varios pares diferentes de dosis diagnóstica y tiempo de diagnóstico pueden brindar resultados interpretables, pero es necesario ser consistente y usar siempre las mismas dosis y tiempos de diagnóstico para cada insecticida y vector en particular, y permitir así realizar comparaciones entre pruebas a través de largos períodos de tiempo. De otra manera, el método no permitiría la evaluación de cambios a través del tiempo en la frecuencia de la resistencia para esas especies.

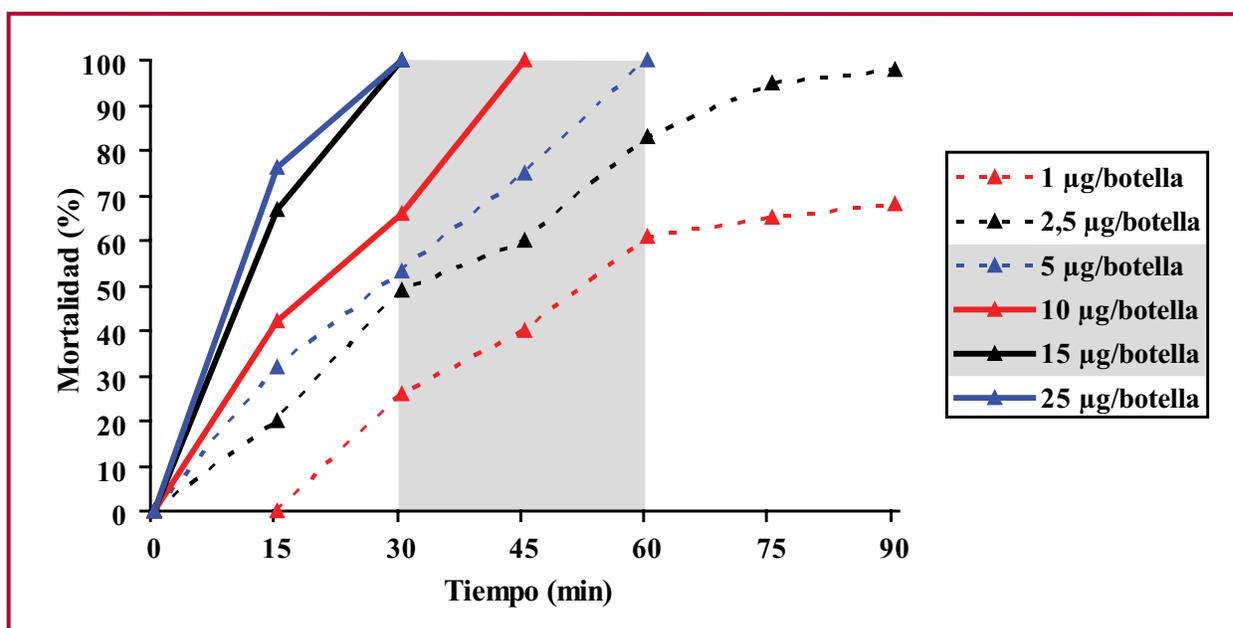


Figura: Determinación de las dosis diagnósticas y tiempos de diagnóstico.

En el ejemplo mostrado, 15 $\mu\text{g}/\text{botella}$ es el punto de saturación, ya que dosis más altas no disminuyeron el tiempo para que el 100% de mosquitos susceptibles mueran. Concentraciones menores que 5 $\mu\text{g}/\text{botella}$ tardan más de 60 minutos en matar el 100% de mosquitos susceptibles, lo cual implicaría que los mosquitos tardarían mucho tiempo en morir con estas concentraciones. Las dosis entre 5 y 15 $\mu\text{g}/\text{botella}$ (área oscura) están en el rango útil para detectar resistencia y el tiempo de diagnóstico para cada una de estas concentraciones sería el tiempo en el cual el 100% de mosquitos mueran. Por ejemplo, una dosis diagnóstica de 10 $\mu\text{g}/\text{botella}$ y tiempo de diagnóstico de 45 min podrían ser seleccionados.

Apéndice 3. Formulario para registro de datos del ensayo biológico de la botella de los CDC

Fecha: _____ Especie de mosquitos: _____

Insecticida: _____

Dosis diagnóstica: _____ Tiempo de diagnóstico: _____

Lugar de recolección de mosquitos: _____

Tiempo (min)	Botella 1		Botella 2		Botella 3		Botella 4		Todas las botellas prueba			Control		
	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos	Total muertos	Total	% muertos	Total muertos	Total	% muertos
0														
15														
30														
35														
40														
45														
60														
75														
90														
105														
120														
Total en botella														