

# PROCEDIMIENTOS PARA EVALUAR LA SUSCEPTIBILIDAD A LOS INSECTICIDAS DE LOS PRINCIPALES MOSQUITOS VECTORES DE LAS AMÉRICAS

**OPS**



Organización  
Panamericana  
de la Salud



Organización  
Mundial de la Salud  
OFICINA REGIONAL PARA LAS  
Américas



# PROCEDIMIENTOS PARA EVALUAR LA SUSCEPTIBILIDAD A LOS INSECTICIDAS DE LOS PRINCIPALES MOSQUITOS VECTORES DE LAS AMÉRICAS

Washington, D.C., 2023

**OPS**



Organización  
Panamericana  
de la Salud



Organización  
Mundial de la Salud  
ORGANIZACIÓN REGIONAL PARA LAS AMÉRICAS

Procedimientos para evaluar la susceptibilidad a los insecticidas de los principales mosquitos vectores de las Américas

© Organización Panamericana de la Salud, 2023

ISBN: 978-92-75-32452-3 (impreso)

ISBN: 978-92-75-32453-0 (pdf)

Algunos derechos reservados. Esta obra está disponible en virtud de la licencia Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Organizaciones intergubernamentales de Creative Commons (CC BY-NC-SA 3.0 IGO; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo/deed.es>).



Con arreglo a las condiciones de la licencia, se permite copiar, redistribuir y adaptar la obra con fines no comerciales, siempre que se utilice la misma licencia o una licencia equivalente de Creative Commons y se cite correctamente, como se indica a continuación. En ningún uso que se haga de esta obra debe darse a entender que la Organización Panamericana de la Salud (OPS) respalda una organización, producto o servicio específicos. No está permitido utilizar el logotipo de la OPS.

**Adaptaciones:** si se hace una adaptación de la obra, debe añadirse la siguiente nota de descargo junto con la forma de cita propuesta: "Esta publicación es una adaptación de una obra original de la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Las opiniones expresadas en esta adaptación son responsabilidad exclusiva de los autores y no representan necesariamente los criterios de la OPS".

**Traducciones:** si se hace una traducción de la obra, debe añadirse la siguiente nota de descargo junto con la forma de cita propuesta: "La presente traducción no es obra de la Organización Panamericana de la Salud (OPS). La OPS no se hace responsable del contenido ni de la exactitud de la traducción".

**Forma de cita propuesta:** Procedimientos para evaluar la susceptibilidad a los insecticidas de los principales mosquitos vectores de las Américas. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 2023. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://doi.org/10.37774/9789275324530>.

**Datos de catalogación:** pueden consultarse en <http://iris.paho.org>.

**Ventas, derechos y licencias:** para adquirir publicaciones de la OPS, escribir a [sales@paho.org](mailto:sales@paho.org). Para presentar solicitudes de uso comercial y consultas sobre derechos y licencias, véase [www.paho.org/permissions](http://www.paho.org/permissions).

**Materiales de terceros:** si se desea reutilizar material contenido en esta obra que sea propiedad de terceros, como cuadros, figuras o imágenes, corresponde al usuario determinar si se necesita autorización para tal reutilización y obtener la autorización del titular del derecho de autor. Recae exclusivamente sobre el usuario el riesgo de que se deriven reclamaciones de la infracción de los derechos de uso de un elemento que sea propiedad de terceros.

**Notas de descargo generales:** las denominaciones empleadas en esta publicación y la forma en que aparecen presentados los datos que contiene no implican, por parte de la OPS, juicio alguno sobre la condición jurídica de países, territorios, ciudades o zonas, o de sus autoridades, ni respecto del trazado de sus fronteras o límites. Las líneas discontinuas en los mapas representan de manera aproximada fronteras respecto de las cuales puede que no haya pleno acuerdo.

La mención de determinadas sociedades mercantiles o de nombres comerciales de ciertos productos no implica que la OPS los apruebe o recomiende con preferencia a otros análogos. Salvo error u omisión, las denominaciones de productos patentados llevan letra inicial mayúscula.

La OPS ha adoptado todas las precauciones razonables para verificar la información que figura en la presente publicación. No obstante, el material publicado se distribuye sin garantía de ningún tipo, ni explícita ni implícita. El lector es responsable de la interpretación y el uso que haga de ese material, y en ningún caso la OPS podrá ser considerada responsable de daño alguno causado por su utilización.

CDE/VT/2023

# Indice

<b>Prefacio</b> .....	<b>ix</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>x</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Bioensayos de la OMS para la evaluación de la susceptibilidad de los mosquitos</b> .....	<b>3</b>
Dosis discriminantes para la evaluación de la susceptibilidad de los mosquitos.....	3
Condiciones para la realización de las pruebas .....	5
Aspectos que deben tenerse en cuenta al realizar bioensayos .....	5
Número de repeticiones de los ensayos.....	6
Salud y seguridad ambiental .....	6
<b>Metodología de tubos de la OMS para la evaluación de la susceptibilidad a los insecticidas</b> .....	<b>7</b>
Materiales para el método de tubos .....	7
Tubos .....	7
Papeles impregnados .....	10
Clips metálicos .....	10
Material biológico.....	10
Materiales complementarios .....	13
Procedimientos de los bioensayos en tubos para evaluar la susceptibilidad de los mosquitos a los insecticidas .....	14
Primer paso: Preparación y etiquetado de los tubos.....	14
Segundo paso: Exposición de los mosquitos.....	15
Tercer paso: Anotar los resultados de mortalidad .....	17
Procedimiento de limpieza .....	17
<b>Metodología de botellas de la OMS para la evaluación de la susceptibilidad a los insecticidas</b> .....	<b>18</b>
Materiales para el método de botellas .....	18
Equipos.....	19
Reactivos y material fungible.....	19
Cría y preparación de los mosquitos para el método de botellas.....	20
Preparación de la solución madre de concentración discriminante .....	20
Preparación de la solución madre .....	20
Conservación y utilización de la solución madre .....	21
Procedimientos de los bioensayos en botellas para evaluar la susceptibilidad de los mosquitos a los insecticidas .....	21
Primer paso: Recubrimiento del interior de las botellas .....	21
Segundo paso: Exposición de los mosquitos.....	23
Procedimiento de lavado de las botellas .....	24
Método genérico de lavado con Decon o TFD4.....	24
Procedimiento de lavado cuando no se dispone de Decon o TFD4 .....	25
<b>Evaluación de la intensidad de la resistencia de los mosquitos a los insecticidas</b> .....	<b>26</b>
<b>Bioensayos de la OMS con un insecticida y un sinergista</b> .....	<b>27</b>
Materiales para el bioensayo en tubos con insecticida y sinergista .....	27
Equipos, reactivos y material fungible .....	28

Insumos complementarios .....	28
Mosquitos .....	28
Procedimientos para determinar la capacidad del butóxido de piperonilo para restablecer la susceptibilidad a los insecticidas piretroides mediante pruebas en tubos .....	29
Primer paso: Etiquetado y preparación de los tubos.....	29
Segundo paso: Exposición de los mosquitos.....	31
Tercer paso: Anotar los resultados de mortalidad .....	33
Procedimiento de limpieza de los tubos .....	33
<b>Bioensayos en botellas de la OMS para evaluar las propiedades esterilizantes del piriproxifeno en hembras de mosquito .....</b>	<b>34</b>
Materiales del bioensayo en botellas para evaluación de piriproxifeno .....	34
Equipamiento .....	34
Insumos complementarios .....	35
Cría y preparación de los mosquitos del bioensayo en botellas para evaluación de piriproxifeno.....	35
Preparación de la solución madre de concentración discriminante .....	36
Procedimientos para el bioensayo en botellas para evaluación de piriproxifeno .....	37
Primer paso: Recubrimiento del interior de las botellas .....	38
Segundo paso: Alimentación de los mosquitos con sangre .....	40
Tercer paso: Exposición de los mosquitos al piriproxifeno en botellas y retención durante 72 horas tras la exposición.....	40
Cuarto paso: Introducción de los mosquitos en cámaras para la oviposición .....	42
Quinto paso: Anotar la tasa de oviposición.....	42
<b>Cálculo, ajuste de mortalidad e interpretación de resultados de las pruebas de evaluación de resistencia de vectores a los insecticidas.....</b>	<b>43</b>
Cálculos y ajustes de mortalidad e interpretación de resultados de los bioensayos en tubos.....	43
Criterio de desestimación de prueba en tubos.....	44
Cálculos y ajustes de mortalidad e interpretación de resultados para bioensayos en botellas.....	44
Criterios de desestimación de prueba en botellas.....	45
Interpretación de resultados de los bioensayos de susceptibilidad en tubos y en botellas.....	45
Cálculos y ajustes de mortalidad e interpretación de resultados de las pruebas de la OMS en tubos que evalúan la capacidad del butóxido de piperonilo para restablecer la susceptibilidad a los insecticidas piretroides .....	45
Criterios de desestimación de prueba para determinar la capacidad del butóxido de piperonilo de restablecer la susceptibilidad de los mosquitos adultos a los insecticidas piretroides mediante pruebas en tubos .....	46
Interpretación de resultados de los bioensayos de la OMS en tubos para determinar la capacidad del butóxido de piperonilo para restablecer la susceptibilidad a los insecticidas piretroides.....	46
Cálculos de mortalidad y ajustes a los cálculos para evaluar las propiedades esterilizantes del piriproxifeno en hembras de mosquito adultas mediante bioensayos en botellas .....	47
Criterios de desestimación de las pruebas de la OMS en botellas que evalúan las propiedades esterilizantes del piriproxifeno en hembras de mosquito .....	48
Interpretación de resultados de los bioensayos en botellas para evaluar las propiedades esterilizantes del piriproxifeno en hembras de mosquito adultas .....	48
Interpretación de los bioensayos de intensidad (5× y 10× de las concentraciones discriminantes) .....	49

<b>Pruebas de susceptibilidad de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades para mosquitos adultos</b> .....	<b>50</b>
Materiales para la realización de pruebas de susceptibilidad.....	51
Material biológico.....	51
Procedimientos para la realización de las pruebas de susceptibilidad.....	53
Preparación de soluciones madre.....	53
1. Preparación de soluciones madre a partir de insecticida de calidad técnica.....	54
2. Preparación de botellas con insecticida.....	55
3. Preparar la botella control del bioensayo.....	55
4. Desarrollo del bioensayo.....	56
5. Lavado de las botellas.....	56
Resultados de las pruebas.....	57
Criterios de mortalidad de las pruebas de la botella.....	58
Interpretación de los resultados provenientes de las pruebas de la botella.....	58
<b>Mecanismos de resistencia a los insecticidas y métodos de detección</b> .....	<b>60</b>
<b>Manejo y utilización de los datos de vigilancia de la resistencia a los insecticidas</b> .....	<b>62</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>64</b>

## Anexos

### Anexo 1.

<b>Dosis de insecticidas (discriminante y de intensidad) para determinar la susceptibilidad de mosquitos <i>Anopheles</i> spp., <i>Aedes</i> spp. y <i>Culex</i> spp. adultos usando las pruebas de la Organización Mundial de la Salud</b> .....	<b>66</b>
A. Concentraciones discriminantes de insecticidas para los bioensayos de susceptibilidad de la OMS con mosquitos <i>Anopheles</i> .....	66
B. Concentraciones discriminantes de insecticidas para los bioensayos de susceptibilidad de la Organización Mundial de la Salud con mosquitos <i>Aedes</i> .....	68
C. Concentraciones discriminantes de insecticidas para los bioensayos de susceptibilidad de la Organización Mundial de la Salud con mosquitos <i>Culex</i> .....	69

### Anexo 2.

<b>Kits para pruebas de susceptibilidad a los insecticidas de la Organización Mundial de la Salud</b> .....	<b>70</b>
Composición del kit de prueba de la Organización Mundial de la Salud .....	70

### Anexo 3.

<b>Conservación de los papeles impregnados</b> .....	<b>71</b>
Conservación de papeles nuevos.....	72
Conservación de los papeles entre rondas de un ensayo .....	72
Conservación de los papeles entre una prueba y otra de la misma ronda del ensayo .....	72

### Anexo 4.

<b>Formulario de recogida de datos para evaluar la susceptibilidad de los mosquitos adultos a los insecticidas mediante pruebas en tubos de la OMS</b> .....	<b>73</b>
--	-----------

### Anexo 5.

<b>Formulario de recogida de datos para los bioensayos en botellas de la Organización Mundial de la Salud</b> .....	<b>75</b>
---	-----------

### Anexo 6.

<b>Cálculos para la preparación de las disoluciones de los ensayos de la Organización Mundial de la Salud</b> .....	<b>78</b>
A. Cálculo de la cantidad de principio activo y de disolvente (acetona) necesaria para preparar la solución madre inicial y las diluciones posteriores a fin de obtener las concentraciones seriadas para el recubrimiento de las botellas .....	78
B. Diluciones de la solución madre con acetona a fin de obtener las concentraciones seriadas del insecticida para el recubrimiento de las botellas .....	79

### Anexo 7.

<b>Formulario recogida de datos para determinar la capacidad del butóxido de piperonilo de restablecer la susceptibilidad a los insecticidas piretroides mediante pruebas en tubos de la Organización Mundial de la Salud</b> .....	<b>80</b>
---	-----------

### Anexo 8.

<b>Formulario de recogida de datos para los bioensayos en botellas con piriproxifeno de la Organización Mundial de la Salud</b> .....	<b>82</b>
---	-----------

### Anexo 9.

<b>Formulario para el registro de datos del ensayo biológico de la botella de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades</b> .....	<b>86</b>
---	-----------



## Figuras

<b>Figura 1.</b>	Diagrama de flujo para evaluar la susceptibilidad a los insecticidas y determinar la intensidad y los mecanismos de resistencia.....	4
<b>Figura 2.</b>	Tubos para pruebas de susceptibilidad.....	8
<b>Figura 3.</b>	Unidad deslizante (en posición cerrada).....	8
<b>Figura 4.</b>	Tubos de mantenimiento y de exposición unidos por la unidad deslizante.....	8
<b>Figura 5.</b>	Unidad deslizante en posición abierta para introducir los mosquitos.....	9
<b>Figura 6.</b>	Unidad deslizante en posición abierta para permitir el paso de los mosquitos a través de los tubos.....	9
<b>Figura 7.</b>	Etapas de la prueba en tubos de la Organización Mundial de la Salud con mosquitos adultos e insecticidas de efecto letal .....	15
<b>Figura 8.</b>	Procedimiento para recubrir el interior de las botellas uniformemente con la acetona.....	22
<b>Figura 9.</b>	Diagrama del proceso de exposición de los mosquitos en las botellas .....	23
<b>Figura 10.</b>	Etapas del bioensayo con un insecticida y un sinergista .....	31
<b>Figura 11.</b>	Etapas del ensayo en botellas de la Organización Mundial de la Salud para evaluar la susceptibilidad de mosquitos adultos al piriproxifeno, un regulador del crecimiento de los insectos .....	37
<b>Figura 12.</b>	Procedimiento para recubrir el interior de las botellas uniformemente con acetona .....	39
<b>Figura 13.</b>	Diagrama del proceso de exposición de los mosquitos al piriproxifeno en botellas de vidrio... ..	40
<b>Figura 14.</b>	Pasos para realizar los bioensayos de susceptibilidad con botellas propuestos por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades .....	57

## Cuadros

<b>Cuadro 1.</b>	Número óptimo de mosquitos adultos para vigilar la resistencia a los insecticidas mediante los bioensayos normalizados de la Organización Mundial de la Salud .....	11
<b>Cuadro 2.</b>	Materiales e insumos de laboratorio para la realización de pruebas de susceptibilidad de una población de mosquitos a uno o más insecticidas.....	13
<b>Cuadro 3.</b>	Definiciones de la Organización Mundial de la Salud para determinar la caída y la mortalidad de los mosquitos tras la prueba.....	17
<b>Cuadro 4.</b>	Diferencias entre los bioensayos en botellas de la Organización Mundial de la Salud y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades.....	18
<b>Cuadro 5.</b>	Directrices de la OMS para determinar la caída y la mortalidad de los mosquitos tras la prueba .....	24
<b>Cuadro 6.</b>	Definiciones de la OMS de caída y mortalidad de los mosquitos tras la prueba.....	33
<b>Cuadro 7.</b>	Condiciones de la prueba y número de individuos necesarios para evaluar la susceptibilidad de los mosquitos silvestres a una concentración discriminante de piriproxifeno mediante bioensayos en botellas de la Organización Mundial de la Salud.....	38
<b>Cuadro 8.</b>	Definiciones de la OMS de caída y mortalidad de los mosquitos tras la prueba .....	41
<b>Cuadro 9.</b>	Diferencias de interpretación de los resultados de susceptibilidad entre los bioensayos en botellas de la Organización Mundial de la Salud y los de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades.....	50

<b>Cuadro 10.</b> Ventajas y desventajas del bioensayo en botellas de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades frente a la prueba en tubos de la Organización Mundial de la Salud para insecticidas .....	51
<b>Cuadro 11.</b> Reactivos, insumos de laboratorio y equipo de protección individual necesarios para realizar la prueba de la botella de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades .....	52
<b>Cuadro 12.</b> Dosis diagnósticas de insecticidas y tiempos de diagnóstico para determinar la susceptibilidad a insecticidas de mosquitos <i>Anopheles</i> y <i>Aedes</i> adultos con las pruebas de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades.....	53
<b>Cuadro 13.</b> Cantidades de insecticida de calidad técnica requeridas para la preparación de soluciones madre de volúmenes diferentes para pruebas de susceptibilidad con metodología de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades .....	54
<b>Cuadro 14.</b> Principales insecticidas utilizados en la lucha antivectorial y mecanismos de resistencia asociados.....	61
<b>Cuadro A3.</b> Período de validez en condiciones óptimas y estabilidad de papeles recién tratados en condiciones de temperatura acelerada.....	71

# Prefacio

Las enfermedades transmitidas por vectores (ETV) constituyen un problema grave de salud pública y, además, repercuten de manera negativa en las condiciones socioeconómicas de los países de América Latina y el Caribe. El abordaje de la problemática de las ETV es complejo y no solo radica en la necesidad de estructurar programas de control de vectores que puedan tratar los aspectos epidemiológicos de dichas enfermedades, sino que también se deben contemplar las características de su transmisión, que depende de las particularidades de cada uno de los vectores.

Ante este panorama, los países de la Región están obligados a elaborar programas de control de vectores que tengan las capacidades necesarias y suficientes para aplicar de manera adecuada las estrategias de control de vectores y de vigilancia entomológica. Como parte de este último componente, la vigilancia de la resistencia de los vectores a los insecticidas es una de las intervenciones clave para asegurar el éxito de la aplicación de las acciones de control vectorial con base en el uso de insecticidas. Por otra parte, es útil para ayudar en la toma de decisiones que fomenten el uso racional de insecticidas y orienten acciones basadas en la evidencia sobre la presencia y la extensión de la resistencia a los insecticidas en las poblaciones de vectores.

Con el fin de apoyar técnicamente a los países en el fortalecimiento de sus capacidades, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha realizado acciones para orientar el desarrollo de documentación técnica y estrategias para fortalecer el uso racional de insecticidas. Mediante la estructuración de la Red de las Américas para la vigilancia y manejo de la resistencia a los insecticidas, se comenzaron a realizar actividades dirigidas a impulsar el desarrollo de planes nacionales de manejo de la resistencia a los insecticidas, además de mejorar las condiciones y la accesibilidad a los insumos para realizar pruebas de susceptibilidad de los vectores a los insecticidas.

El presente documento es parte de las acciones que la OPS lleva a cabo para fortalecer y mejorar las capacidades del personal de salud responsable de efectuar los bioensayos. Se describen aquí los procedimientos de las metodologías vigentes para la realización de las pruebas de susceptibilidad de vectores a los insecticidas (pruebas en tubos y en botellas). Por último, el documento también es parte del esfuerzo de la OPS por mejorar el acceso del personal de salud a documentación técnica que ayude a mejorar la vigilancia de la resistencia a los insecticidas y la prevención de su desarrollo.



# Agradecimientos

Esta publicación se elaboró bajo la supervisión técnica de Dennis Navarro Costa (Oficial Técnico para el Control y la Prevención de las Enfermedades Transmitidas por Vectores) y Haroldo Sérgio da Silva Bezerra (Asesor en Entomología Aplicada a la Salud Pública), de la Organización Panamericana de la Salud (OPS). El informe fue redactado por Manuela Herrera-Varela (consultora) y Dennis Navarro Costa.

Los revisores técnicos agradecen especialmente a los siguientes profesionales por su colaboración y el aporte de sus conocimientos especializados: Martha Quiñonez, de la Universidad Nacional de Colombia; José Bento Pereira Lima, del Laboratorio de Fisiología y Control de Artrópodos Vectores de la Fundación Oswaldo Cruz (Brasil); Audrey Lenhart, de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Estados Unidos de América); Pablo Manrique, de la Universidad Autónoma de Yucatán (México); Ariel Toloza, del Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (Argentina); y Tamara Chávez Espada y Marco Fidel Suárez, consultores independientes.

La edición y revisión final del documento estuvo a cargo de Dennis Navarro Costa y Haroldo Sérgio da Silva Bezerra, ambos de la OPS. Esta publicación fue elaborada por la OPS gracias al apoyo financiero de la Agencia de Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID, por su sigla en inglés), en virtud del acuerdo n° AID-LAC-IO-16-00002. Las opiniones expresadas por los autores en esta publicación no reflejan necesariamente los puntos de vista de la USAID o del Gobierno de Estados Unidos de América.



# Introducción

El uso seguro y eficaz de insecticidas contra las poblaciones de larvas de mosquitos y ejemplares adultos es una de las formas de interrumpir con rapidez la transmisión de enfermedades como la malaria, el zika, el chikunguña y el dengue; sin embargo, el uso extensivo y frecuente de los insecticidas ha ocasionado la aparición de resistencia a estos compuestos en varias poblaciones de insectos, incluidos los pertenecientes a los géneros *Anopheles*, *Aedes* y *Culex* (1).

El monitoreo de la resistencia a los insecticidas en las poblaciones de vectores es una parte esencial de la vigilancia entomológica, para determinar los niveles, los mecanismos y la distribución geográfica de la resistencia con el fin de incorporar su manejo en los programas de control. Las decisiones basadas en la evidencia sobre el estado de la resistencia de los vectores a los insecticidas asegurarán que se seleccionen intervenciones de control de vectores e insecticidas apropiados y efectivos. Los cambios en el estado de susceptibilidad a los insecticidas también deberían dirigir las decisiones políticas y operativas (2).

Los procedimientos existentes para la caracterización de la resistencia de los vectores a los insecticidas permiten evaluar los siguientes aspectos:

- Presencia de resistencia fenotípica a los insecticidas en una población de vectores.
- Intensidad de la resistencia fenotípica.
- Efecto de un sinergista en el restablecimiento de la susceptibilidad a un insecticida en una población de vectores resistentes.
- Los mecanismos responsables de la resistencia fenotípica.

Los tres procedimientos normalizados para evaluar la susceptibilidad de los vectores a los insecticidas, la intensidad de resistencia fenotípica y la capacidad de un sinergista para restablecer la susceptibilidad de poblaciones de vectores previamente identificadas como resistentes a insecticidas, son los siguientes:

- Prueba en tubos de la Organización Mundial de la Salud (OMS).
- Bioensayo en botellas de la OMS.
- Bioensayo en botellas de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América (CDC).

El propósito de la presente publicación consiste en aumentar el acceso a la información disponible sobre los procedimientos para llevar a cabo evaluaciones de susceptibilidad y, de esa manera, garantizar la calidad de los procedimientos y estandarizar e incrementar el conocimiento y las habilidades de los responsables de dichos procesos. Todo esto permitirá asegurar la obtención de información sólida y confiable acerca del estado de situación de la resistencia de las poblaciones de vectores a los insecticidas.

Este trabajo reúne los procedimientos de las pruebas descritas por la OMS y por los CDC para la detección de la resistencia a los insecticidas y la medición de la intensidad de la resistencia de formas adultas de *Anopheles* spp. y *Aedes* spp. y *Culex* spp., incluidos los reguladores del crecimiento de insectos (RCI) y los productos para el control biológico de vectores. Esta publicación se basa en el manual para la vigilancia de la resistencia de los mosquitos vectores a los insecticidas y la selección de intervenciones adecuadas (1), publicado por la OMS en el 2022, y en los procedimientos operativos normalizados de cada uno de los bioensayos desarrollados para evaluar la susceptibilidad de los vectores a los insecticidas. En la misma línea con las actualizaciones de la OMS sobre la temática, se añadan, actualizan y reemplazan las anteriores orientaciones para la vigilancia de la resistencia de los mosquitos *Anopheles*, *Culex* y *Aedes* que se ofrecen en la segunda edición de los *Procedimientos de las pruebas para la vigilancia de la resistencia a los insecticidas en los mosquitos vectores del paludismo* (3) y en las directrices provisionales para entomólogos sobre la vigilancia y el manejo de la resistencia a los insecticidas en poblaciones de mosquito *Aedes* (4).

De igual forma, con el objetivo de asegurar el cumplimiento sistemático de los procedimientos y las condiciones necesarias para realizar los bioensayos, en la presente publicación se detallan y consolidan los procedimientos operacionales normalizados elaborados por la OMS para cada una de las pruebas dirigidas a establecer la susceptibilidad de los mosquitos a los insecticidas. Su alcance no incluye pruebas acerca de la resistencia de las larvas de mosquitos, si bien se prevé su actualización cuando la OMS valide los procedimientos para larvas de mosquitos (5) u otras especies de vectores.

Este documento está dirigido principalmente al personal técnico de los niveles nacional y subnacional responsable de evaluar la susceptibilidad y la resistencia de las poblaciones locales de mosquitos vectores de enfermedades como parte cotidiana de las actividades de vigilancia entomológica. Para obtener más información sobre los mecanismos de resistencia a los insecticidas, véase el manual de la OMS para la vigilancia de la resistencia de los mosquitos vectores a los insecticidas y la selección de intervenciones adecuadas (1).

# Bioensayos de la OMS para la evaluación de la susceptibilidad de los mosquitos

La OMS ha desarrollado dos bioensayos para obtener datos de resistencia a los insecticidas, la prueba en tubos y el bioensayo en botellas. Las pruebas para medir la susceptibilidad a insecticidas de mosquitos adultos de la OMS son procedimientos que permiten obtener una respuesta directa de la exposición de los mosquitos a una concentración conocida de los insecticidas. Con esta prueba se logra medir la mortalidad de los mosquitos cuando son expuestos al insecticida evaluado. Se pueden llevar a cabo pruebas para:

1. Evaluar la susceptibilidad de los mosquitos a dosis discriminantes, también llamadas *dosis diagnósticas* (bioensayos de susceptibilidad).
2. Determinar la intensidad de la resistencia de los mosquitos a los insecticidas (bioensayos de intensidad).
3. Determinar la capacidad de un sinergista para restablecer la susceptibilidad de mosquitos identificados como resistentes a un insecticida dado (bioensayos con un insecticida y un sinergista).

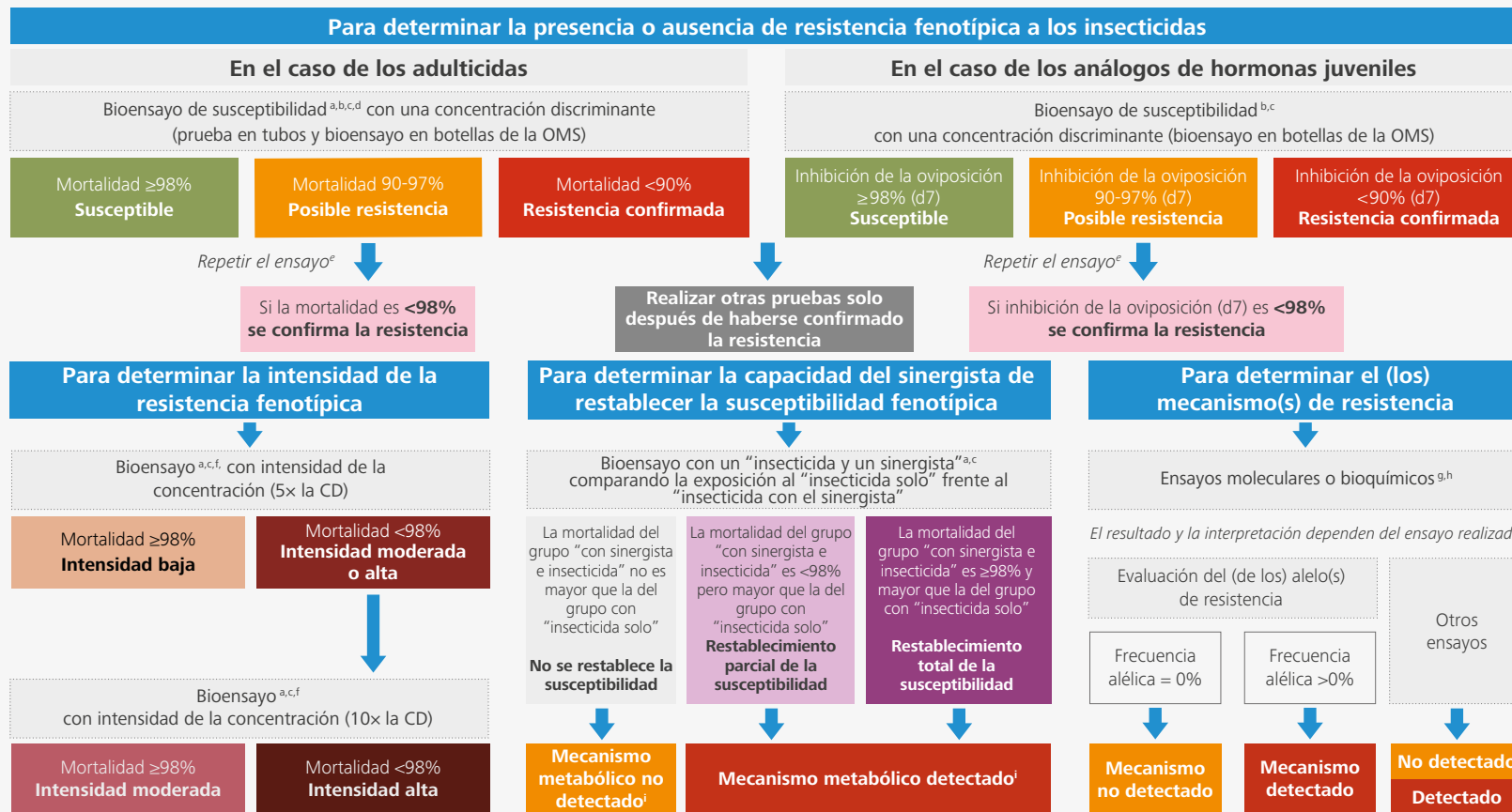
Una vez determinada la presencia o no de resistencia y su grado de intensidad, se pueden realizar las pruebas correspondientes para identificar los mecanismos de resistencia. En la figura 1 se muestra un flujograma para la realización de las pruebas de susceptibilidad (1).

Los bioensayos de la OMS sirven para identificar la presencia de resistencia de una población de vectores a los insecticidas. Mediante estos bioensayos se determina la respuesta fenotípica de una muestra de vectores a la exposición a un insecticida. Existen dos procedimientos estandarizados de la OMS para evaluar la susceptibilidad de los mosquitos a los insecticidas.

1. Prueba en tubos de la OMS, en la cual se exponen mosquitos adultos a papeles impregnados con la concentración discriminante de un insecticida en tubos de plástico diseñados específicamente para ese fin.
2. Bioensayo en botellas de la OMS, desarrollado para evaluar insecticidas que por sus propiedades químicas no pueden ser impregnados en papeles de filtro.

Ambas pruebas permiten calcular el porcentaje de mosquitos resistentes en una población y consisten en exponer mosquitos durante 1 hora, ya sea a papeles de filtro o a botellas tratadas con la concentración discriminante de un insecticida. Después de un tiempo de exposición determinado se miden los efectos fenotípicos deseados de los insecticidas, ya sea la mortalidad de los mosquitos (adulticidas) o la inhibición de la oviposición (piriproxifeno). Si al final del período de retención los mosquitos evaluados sobreviven, o si la oviposición (al evaluar piriproxifeno) no varía o lo hace en pequeña medida, se consideran resistentes al insecticida.

**Figura 1. Diagrama de flujo para evaluar la susceptibilidad a los insecticidas y determinar la intensidad y los mecanismos de resistencia**



**Notas:**

- a La mortalidad ha de ajustarse mediante la fórmula de Abbott si la mortalidad de los controles es del 5%-20%.
- b La mortalidad se determina 24 h después de 1 h de exposición al insecticida (72 h después de la exposición en caso del clorfenapir o el piriproxifeno). En los bioensayos con clorfenapir o piriproxifeno, se debe realizar un ensayo con una cepa susceptible en paralelo al ensayo con los mosquitos silvestres.
- c El ensayo se desecha cuando la mortalidad de los controles al finalizar el período de retención sea  $> 20\%$ , bien en la población silvestre o bien en la cepa susceptible (nota: solo se evalúan cepas susceptibles en el caso del clorfenapir y el piriproxifeno). En el caso del piriproxifeno, el ensayo debe desecharse si la tasa de oviposición 7 días después de la exposición al insecticida es  $< 30\%$  en cualquiera de los dos grupos de control (el de la población silvestre o el de la cepa susceptible) o  $< 98\%$  en el grupo expuesto de la cepa susceptible.

CD: concentración discriminante. OMS: Organización Mundial de la Salud.

- d En los bioensayos con clorfenapir solo puede confirmarse la resistencia si la mortalidad 72 h después de 1 h de exposición es  $< 90\%$  en tres ensayos realizados con la misma población de vectores en distintos momentos.
- e Con una nueva muestra de la misma población de mosquitos.
- f Los papeles impregnados con las concentraciones 5x y 10x pueden adquirirse a la Universidad de Ciencias de Malasia (solo en el caso de los insecticidas piretroides).
- g Debe realizarse con mosquitos evaluados en bioensayos de resistencia.
- h Evaluar únicamente los mecanismos de resistencia conocidos.
- i Se refiere a los tipos generales de mecanismos relacionados con el sinergista concreto utilizado en los bioensayos (por ejemplo, las monoxigenasas del citocromo P450 en el caso de butóxido de piperonilo). Que el sinergista no sea capaz de restablecer la susceptibilidad implica que existen otros mecanismos de resistencia.



## Dosis discriminantes para la evaluación de la susceptibilidad de los mosquitos

La dosis discriminante o dosis diagnóstica es la concentración de insecticida que, combinada con un tiempo de exposición predefinido, se usa para determinar las proporciones de fenotipos susceptibles y resistentes en una muestra de una población de mosquitos. La OMS ha definido las dosis discriminantes para la evaluación en condiciones de laboratorio para la mayoría de los insecticidas que se utilizan hoy en día en el control de mosquitos *Anopheles*, *Aedes* y *Culex* (1).

Es importante resaltar que una población de mosquitos es considerada susceptible cuando no ha estado sometida a presión selectiva por insecticidas y no alberga, o alberga muy pocos, individuos resistentes. La metodología para la evaluación de la resistencia de los *Anopheles*, *Aedes* y *Culex* a los insecticidas es la misma (1,2). En el anexo 1 se muestran las dosis discriminantes y las dosis de prueba para la evaluación de la intensidad de la resistencia.

La OMS, en colaboración con la Universidad de Ciencias de Malasia, se encarga de proveer papeles impregnados de insecticida en las correspondientes dosis discriminantes a todas las instancias que requieran evaluar la susceptibilidad de los vectores a los insecticidas (1).

## Condiciones para la realización de las pruebas

Las pruebas deben realizarse en un ambiente libre de contaminación con insecticida, sin exposición directa al sol, con buena iluminación y, de preferencia, con paredes claras. Asimismo, se debería contar con un espacio limpio y seco, preferiblemente una mesa donde se puedan ubicar los tubos.

Debido a que la temperatura ambiental puede influir en la toxicidad de los insecticidas, y la humedad relativa podría afectar la supervivencia de los mosquitos (sobre todo en el período de espera), es importante supervisar ambos aspectos durante todo el desarrollo de la prueba. Lo ideal es realizar los ensayos a una temperatura del 27 °C ( $\pm 2$  °C) y con una humedad relativa del 75% ( $\pm 10\%$ ). No se recomienda realizar las pruebas en un ambiente con una temperatura mayor que 30 °C. Si bien es importante hacer el seguimiento de ambos parámetros, se debe registrar la información sobre la zona de estudio, las características de los mosquitos estudiados y de la muestra (método de recolección, edad, estado fisiológico y especie), y los datos sobre el o los insecticidas analizados y las condiciones experimentales, además de los valores presentes al inicio y al final del procedimiento. En los anexos 4, 5, 7, 8, 9 y 10 se presentan los formularios para registrar las recolecciones de mosquitos y las condiciones de cada una de las pruebas (1).

Durante los ensayos, en caso de no contar con un insectario o una cámara climatizada, los tubos o las botellas deben situarse en un lugar protegido y sombreado, además de mantenerse en un recipiente (por ejemplo, caja isotérmica) cubierto con una toalla húmeda. En el recipiente deberá introducirse un termómetro o un registrador de datos de temperatura y un higrómetro para controlar el intervalo de temperatura y humedad durante los bioensayos (1).

Para que los datos de vigilancia de la resistencia obtenidos sean confiables y comparables, es imperativo que en todos los laboratorios se observen sistemáticamente las condiciones y los procedimientos normalizados de ensayo. En este apartado se indica el número recomendado de repeticiones y de mosquitos para cada tipo de bioensayo y las condiciones ambientales recomendadas. Asimismo, se ofrece orientación sobre la adquisición del material para los ensayos y sobre el número máximo de usos y las condiciones de conservación de los papeles impregnados y los frascos recubiertos.

## Aspectos que deben tenerse en cuenta al realizar bioensayos

Cumplir sistemáticamente los procedimientos establecidos para los bioensayos y asegurar las condiciones de los ambientes dispuestos para su realización es fundamental para que los datos de vigilancia de la resistencia obtenidos sean confiables y comparables.

### Número de repeticiones de los ensayos

Para asegurar la calidad de la determinación de la mortalidad de los mosquitos en los bioensayos normalizados, se deben tener presentes las siguientes orientaciones (1):

- Incluir suficientes tubos o botellas en cada bioensayo para contrarrestar las variaciones biológicas aleatorias de los resultados.
- Utilizar múltiples tubos o botellas reducirá el error al determinar la mortalidad de los mosquitos y aumentará la fiabilidad de los resultados.
- Incluir tubos o botellas de control en cada bioensayo para tener en cuenta la mortalidad no causada por los insecticidas (es decir, la debida a factores externos como la manipulación de los mosquitos, las condiciones ambientales del ensayo, la contaminación de los tubos o las botellas, etc.), que puede llevar a la falsa conclusión de que una población de vectores es susceptible a un insecticida.
- Los tubos de control contienen papeles tratados con una mezcla de un aceite transportador y acetona o con acetona sola.
- Las botellas de control se tratan con acetona o con una mezcla de un tensioactivo y acetona. La mortalidad observada en botellas o tubos de control se utiliza para corregir la mortalidad de las botellas o tubos de tratamiento mediante la fórmula de Abbott.

## Salud y seguridad ambiental

Los aspectos mencionados en esta sección deben ser considerados para la ejecución de todos los bioensayos (1).

- Antes de utilizar cualquiera de los compuestos químicos, el personal del laboratorio debe leer y entender la evaluación de riesgos, las etiquetas, las fichas de seguridad y la evaluación de control de sustancias peligrosas para la salud de cada sustancia química que se vaya a emplear.
- Para la manipulación de insecticidas, debe usarse equipo de protección personal en todo momento (bata de laboratorio, guantes, gafas de seguridad y mascarilla cuando se pesen productos químicos).
- Antes de realizar la prueba, se debe comprobar que todas las zonas de trabajo estén limpias y libres de cualquier otro material.
- Todo el personal que trabaja en el laboratorio debe haber recibido capacitación inicial de laboratorio, que ha de figurar en los respectivos expedientes de formación profesional.
- Todo el personal que emplee este procedimiento debe saber manejar correctamente una campana de extracción de gases.
- Todos los productos de desecho deben eliminarse como corresponda, conforme a las directrices de seguridad nacionales o institucionales.
- Cuando se trabaje con mosquitos se ha de evitar que escapen, manteniendo todas las puertas y ventanas cerradas. Si alguno escapa, debe emplearse inmediatamente una raqueta eléctrica para electrocutarlo.

# Metodología de tubos de la OMS para la evaluación de la susceptibilidad a los insecticidas

El bioensayo con tubos de la OMS evalúa directamente la respuesta a la exposición de mosquitos a una concentración estándar de un insecticida (por ejemplo, concentración discriminante) durante una hora, para determinar la mortalidad de los mosquitos 24 horas después de la exposición. El procedimiento es útil para evaluar la susceptibilidad de los mosquitos a los insecticidas que pueden impregnarse en papeles de filtro. En el caso de insecticidas que no pueden impregnarse o resultan inestables en papeles de filtro, debe realizarse el bioensayo en botellas de la OMS (1).

## Materiales para el método de tubos

A continuación, se detallan los materiales necesarios para realizar las pruebas en tubos de la OMS (1,6).

### Tubos

Los tubos plásticos son suministrados por la OMS, en colaboración con la Universidad de Ciencias de Malasia, al igual que los otros insumos para la realización de las pruebas (véase el anexo 2). Los tubos miden 125 mm de longitud y 44 mm de diámetro. En uno de los extremos, están cubiertos por una malla de tamiz número 16 (1,19 mm de abertura), mientras que en el otro cuentan con una rosca que se une a las unidades deslizantes. Para la realización de las pruebas se usan tres grupos de tubos, cada uno marcado con un punto de color (figura 2):

1. Tubos de exposición con punto rojo: en ellos se expone a los mosquitos al insecticida.
2. Tubos de exposición con punto amarillo: en ellos se expone a los mosquitos a papeles impregnados con aceite.
3. Tubos de retención con punto verde: son tubos de mantenimiento y sirven para contener a los mosquitos antes de la prueba y después de ella.

Los tubos se conectan a través de unidades deslizantes (figura 3), que son piezas del mismo material que los tubos con roscas en ambos extremos para unirlos (figura 4). En medio de las unidades deslizantes se desliza una pieza rectangular que tiene una ventana de 15 mm de diámetro en una de sus mitades (figura 3). Esta pieza sirve para separar o conectar los tubos de control a los tubos de exposición mientras los mosquitos se encuentran en cada uno de ellos (figura 4) (1).

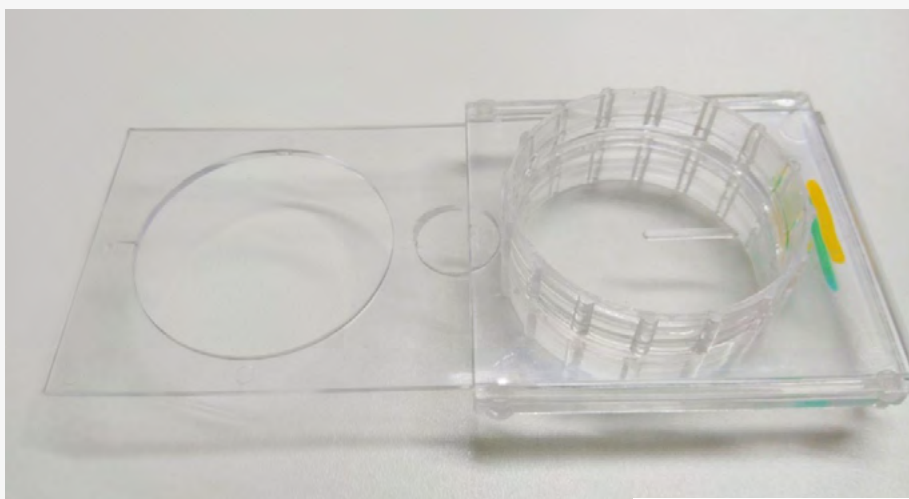
En las figuras 5 y 6 se muestra la unidad deslizante abierta para introducir los mosquitos y permitir el paso de estos entre los tubos.

**Figura 2. Tubos para pruebas de susceptibilidad**



© Dennis Navarro Costa/OPS

**Figura 3. Unidad deslizante (en posición cerrada)**



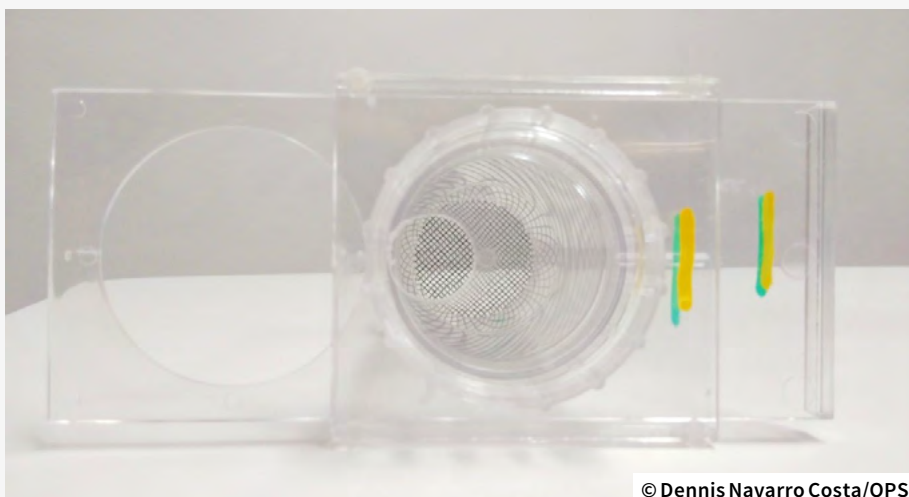
© Dennis Navarro Costa/OPS

**Figura 4. Tubos de mantenimiento y de exposición unidos por la unidad deslizante**



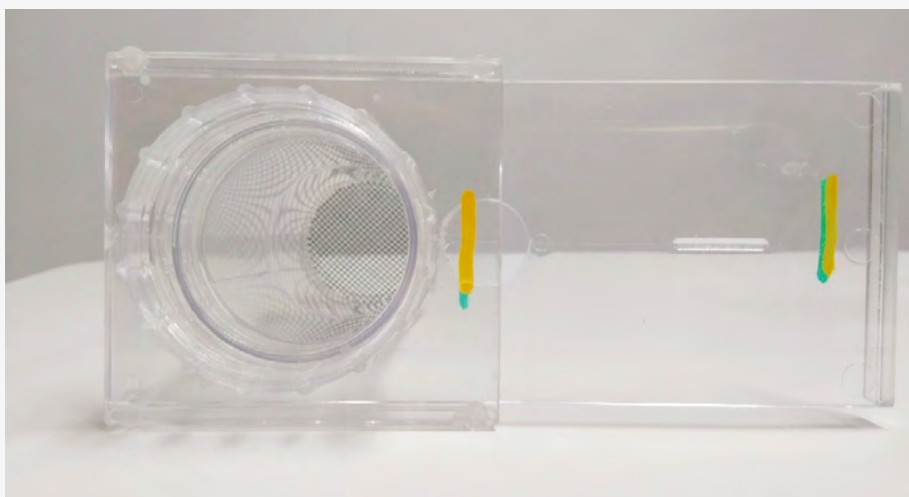
© Dennis Navarro Costa/OPS

**Figura 5. Unidad deslizante en posición abierta para introducir los mosquitos**



© Dennis Navarro Costa/OPS

**Figura 6. Unidad deslizante en posición abierta para permitir el paso de los mosquitos a través de los tubos**



© Dennis Navarro Costa/OPS



## **Papeles impregnados**

Al igual que los tubos, la OMS suministra los papeles de filtro (Whatman® n.º 1) impregnados con insecticida en colaboración con la Universidad de Ciencias de Malasia (véase el anexo 2). En esta institución, y gracias a la orientación del Equipo de Precalificación<sup>1</sup> de la OMS (PQT, por su sigla en inglés), se producen estos papeles impregnados con principios activos y en diferentes concentraciones de insecticidas usados para el control de vectores de importancia en salud pública. Según su función y objetivo, estos papeles pueden ser impregnados con (1):

1. Insecticidas.
2. Aceites de control. El papel es impregnado de aceite transportador para utilizar como control (para evaluar el pirimifos-metil debe emplearse papel de filtro Whatman® n.º 1 tratado con acetona sola).
3. Compuestos sinérgicos.

Los papeles impregnados se sujetan con unas argollas metálicas dentro de los tubos forrando las paredes. Los papeles impregnados se distribuyen en cajas plásticas que contienen ocho unidades. Los papeles con concentraciones 5× y 10× se usan durante las evaluaciones de la intensidad de la resistencia de los mosquitos a un determinado insecticida. Las recomendaciones sobre el uso y mantenimiento de los papeles impregnados se encuentran en el anexo 3 (6).

## **Clips metálicos**

Los clips metálicos son argollas usadas para fijar el papel en la pared de los tubos. Pueden ser de dos materiales:

1. Clips de acero, que se usan para sujetar el papel en los tubos con punto verde (tubos de mantenimiento).
2. Clips de cobre, que se usan para sujetar el papel en los tubos con punto rojo (tubos de exposición) y amarillo (tubos de control).

## **Material biológico**

Las orientaciones sobre los mosquitos que deben ser evaluados aplican tanto para el método de tubos como para el método de botellas de la OMS (1,6).

- Para llevar a cabo este bioensayo se necesitan 150 hembras de mosquito adultas, de 3 a 5 días de edad y no alimentadas con sangre. Antes de la prueba, los mosquitos han de permanecer dos horas sin alimentarse.
- Durante la cría, los mosquitos deben mantenerse bien alimentados, en bandejas sin aglomeraciones durante las fases larvianas y en jaulas sin aglomeraciones durante la fase adulta. Se trata de un requisito importante para reducir en lo posible la mortalidad por causas distintas de la exposición al insecticida.
- Durante el período de exposición, es importante que cada tubo contenga 25 mosquitos o una cantidad lo más próxima posible, pero no se debe exceder esa cifra para evitar aglomeraciones.
- Si el número de mosquitos disponibles para un bioensayo es menor a 25 se aconseja distribuirlos de forma que cada tubo o botella contenga una cantidad de mosquitos lo más cercano posible a 25. En el cuadro 1 se indica el número óptimo recomendado de mosquitos para cada tipo de bioensayo.

////////////////////////////////////

1 Desde el 2016, la precalificación de productos para el control de vectores, que estaba a cargo del Plan OMS de Evaluación de plaguicidas (WHOPEs, por su sigla en inglés), pasó al Equipo de Evaluación de Productos de Control de Vectores de la Unidad de Precalificación (PQT / VCP), por su sigla en inglés) de la Organización Mundial de la Salud.

**Cuadro 1. Número óptimo de mosquitos adultos para vigilar la resistencia a los insecticidas mediante los bioensayos normalizados de la Organización Mundial de la Salud**

BIOENSAYO	N.º TOTAL DE MOSQUITOS POR ENSAYO	CONTROL		TRATAMIENTO	
		N.º de mosquitos por tubo o botella	N.º de tubos o botellas por ensayo	N.º de mosquitos por tubo o botella	N.º de tubos o botellas por ensayo
Bioensayo de susceptibilidad (todos los insecticidas excepto piriproxifeno y clorfenapir)	150	25	2	25	4
Bioensayos de susceptibilidad con clorfenapir	900 (450 mosquitos silvestres y 450 de una colonia susceptible a fin de completar los 3 ensayos necesarios para confirmar la resistencia)	25	12 (4 tubos o botellas —2 para mosquitos silvestres, 2 para los de una colonia susceptible— en cada uno de los 3 ensayos necesarios para confirmar la resistencia)	25	24 (8 tubos o botellas —4 para mosquitos silvestres, 4 para los de una colonia susceptible— en cada uno de los 3 ensayos necesarios para confirmar la resistencia)
Bioensayos de susceptibilidad con piriproxifeno	400 (200 mosquitos silvestres y 200 de una colonia susceptible)	25	8 (4 para mosquitos silvestres y 4 para los de una colonia susceptible)	25	8 (4 para mosquitos silvestres y 4 para los de una colonia susceptible)
Bioensayos de intensidad	250 (para evaluar simultáneamente 5× y 10× la CD)	25	2	25	4 por concentración evaluada (8 para evaluar 5× y 10× la CD)
	300 (para evaluar 5× y 10× la CD por separado)	25	2 por concentración evaluada (4 para evaluar 5× y 10× la CD)		
Bioensayos con un insecticida y un sinergista <sup>a</sup>	400 (100 × 4 rondas del ensayo)	25	4 (1 en cada ronda del ensayo)	25	12 (1 tubo para cada una de las 3 vías de exposición en cada ronda del ensayo)

Notas:

<sup>a</sup> Si no se dispone de mosquitos suficientes, cada ronda del ensayo se puede realizar con dos o más tubos o botellas por vía de exposición, de modo que el número de mosquitos de control necesarios sea menor (cada vez que se lleve a cabo un bioensayo se requieren mosquitos de control).  
CD: concentración discriminante.

Fuente: Organización Mundial de la Salud. Manual for monitoring insecticide resistance in mosquito vectors and selecting appropriate interventions [Internet]. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/356964>.

**Si no se dispone de la cantidad recomendada de mosquitos (1):**

- Cuando no sea posible evaluar el número recomendado de mosquitos en un solo día, se pueden realizar los ensayos a lo largo de varios días.
- Los mosquitos evaluados deben proceder de la misma población de vectores (recolectados en la misma localidad y con el mismo método).
- Si se utiliza la generación F1, los mosquitos deben tener de 3 a 5 días de edad (o de 5 a 7 días en el caso de evaluación del piriproxifeno).

Los bioensayos de susceptibilidad de la OMS pueden repetirse durante unos días hasta alcanzar el tamaño muestral recomendado, siempre y cuando se utilicen como mínimo dos tubos o botellas de exposición y dos de control en paralelo en cada ensayo.

En el caso de los bioensayos de intensidad de la OMS, las diferentes concentraciones de insecticidas también pueden evaluarse en distintos días. Para cada concentración, se puede evaluar conjuntos de dos tubos de exposición y dos tubos de control cada día durante unos días.

En el caso de los bioensayos de la OMS con un insecticida y un sinergista, el proceso de evaluación puede repetirse en distintos días hasta alcanzar el tamaño muestral recomendado. Cada repetición debe realizarse con cuatro tubos como mínimo; es decir, uno para la exposición al sinergista solo, otro para el sinergista seguido de insecticida, otro para el insecticida solo y otro de control.

Las pruebas que se realicen con una cantidad de mosquitos menor a la recomendada pueden ser útiles para localizar zonas de posible resistencia de los vectores; sin embargo, la capacidad de un ensayo para determinar la presencia real de resistencia disminuye si la cantidad de mosquitos evaluados es menor. Si se detecta resistencia utilizando un número de mosquitos inferior al recomendado, deberán realizarse más ensayos para confirmarla.

Las evaluaciones de susceptibilidad pueden llevarse a cabo en el transcurso del año cuando se disponga de mosquitos suficientes para llevar a cabo los bioensayos. Pero, si no se cuenta con mosquitos suficientes para realizar el bioensayo deseado, deben priorizarse bioensayos que puedan servir para la toma de decisiones programáticas prioritarias.



## Materiales complementarios

En el cuadro 2 se muestran los materiales e insumos de laboratorio, los equipos de protección individual y la cantidad de materiales necesarios para realizar las pruebas de susceptibilidad de una población de mosquitos a determinado insecticida (6).

### Cuadro 2. Materiales e insumos de laboratorio para la realización de pruebas de susceptibilidad de una población de mosquitos a uno o más insecticidas

Insumos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cámara de prueba o insectario climatizado a <math>27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}</math> de temperatura y <math>75\% \pm 10\%</math> de humedad relativa</li> <li>• Calentador o aire acondicionado ambiental (si correspondiera)</li> <li>• Humidificador ambiental (si correspondiera)</li> <li>• Refrigeradores (para guardar los papeles impregnados)</li> <li>• Jaula para contener las hembras de mosquito (25 por tubo)</li> <li>• Termohigrómetro</li> <li>• Cronómetro</li> <li>• Monitores o registradores de datos de temperatura y humedad, calibrados y de registros rastreables</li> <li>• Fichas de registro de mortalidad para la prueba (anexo 4)</li> <li>• Algodón de uso médico</li> <li>• Trozos de malla</li> <li>• Glucosa para preparar una solución acuosa azucarada al 10% (p/v) o agua azucarada</li> <li>• Tubos de microcentrífuga</li> <li>• Pinzas</li> <li>• Gel de sílice</li> <li>• Cinta de enmascarar</li> <li>• Rotuladores permanentes para etiquetar los tubos</li> <li>• Papel de tipo Bond o similar</li> <li>• Aspiradores para mosquitos bucales o mecánicos</li> <li>• Acetona o alcohol (para limpiar el material de vidrio y la mesa de trabajo)</li> <li>• Limpiador antibacteriano (por ejemplo, isopropanol o etanol al 70%)</li> </ul>
Materiales	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 tubos de exposición con punto rojo</li> <li>• 2 tubos para controles con punto amarillo</li> <li>• 6 tubos de retención con punto verde</li> <li>• 6 unidades deslizantes</li> <li>• 4 papeles de filtro impregnados con el insecticida a evaluar</li> <li>• Papeles impregnados: cada caja contiene 8 hojas de papel impregnado de insecticida (concentraciones discriminantes en el anexo 1).</li> <li>• Papeles de control: cada caja contiene 8 hojas de papel impregnado de aceite transportador para utilizar como control (para evaluar el pirimifos-metil debe emplearse papel de filtro Whatman® n.º 1 tratado con acetona sola).</li> <li>• 6 hojas de papel blanco limpio (12 cm × 15 cm) para forrar los tubos de mantenimiento</li> <li>• 6 clips de cobre</li> <li>• 6 clips de acero</li> <li>• 120 a 150 mosquitos hembra</li> </ul>
Equipo de protección individual	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata</li> <li>• Guantes</li> <li>• Gafas de protección</li> </ul>

Fuente: Organización Mundial de la Salud. Manual for monitoring insecticide resistance in mosquito vectors and selecting appropriate interventions [Internet]. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/356964>.

## Procedimientos de los bioensayos en tubos para evaluar la susceptibilidad de los mosquitos a los insecticidas

A continuación, se describen los procedimientos (figura 7) para realizar las pruebas de la OMS para evaluar la susceptibilidad de los mosquitos a los insecticidas. Durante todos los procesos, es obligatorio respetar las normas y medidas de bioseguridad para laboratorios y las normas específicas para la manipulación de insecticidas (1,6).

### Primer paso: Preparación y etiquetado de los tubos

Como se mencionó anteriormente, los kits de tubos de la OMS para los bioensayos son de tres tipos:

- Los tubos de retención, identificados por un punto verde, en los que se introduce un papel blanco limpio.
- Los tubos de control, identificados por un punto amarillo, en los que se introduce un papel de filtro tratado con aceite o acetona.
- Los tubos de exposición, identificados por un punto rojo, en los que se introduce un papel de filtro tratado con insecticida.

1. En los tres tipos de tubos hay que pegar una etiqueta adhesiva y, con un rotulador permanente, anotar los datos correspondientes a cada uno. La información registrada es importante para verificar que no se haya superado el tiempo de caducidad de los papeles ni el número máximo de usos.

El etiquetado debe realizarse anotando la siguiente información para cada tipo de tubo:

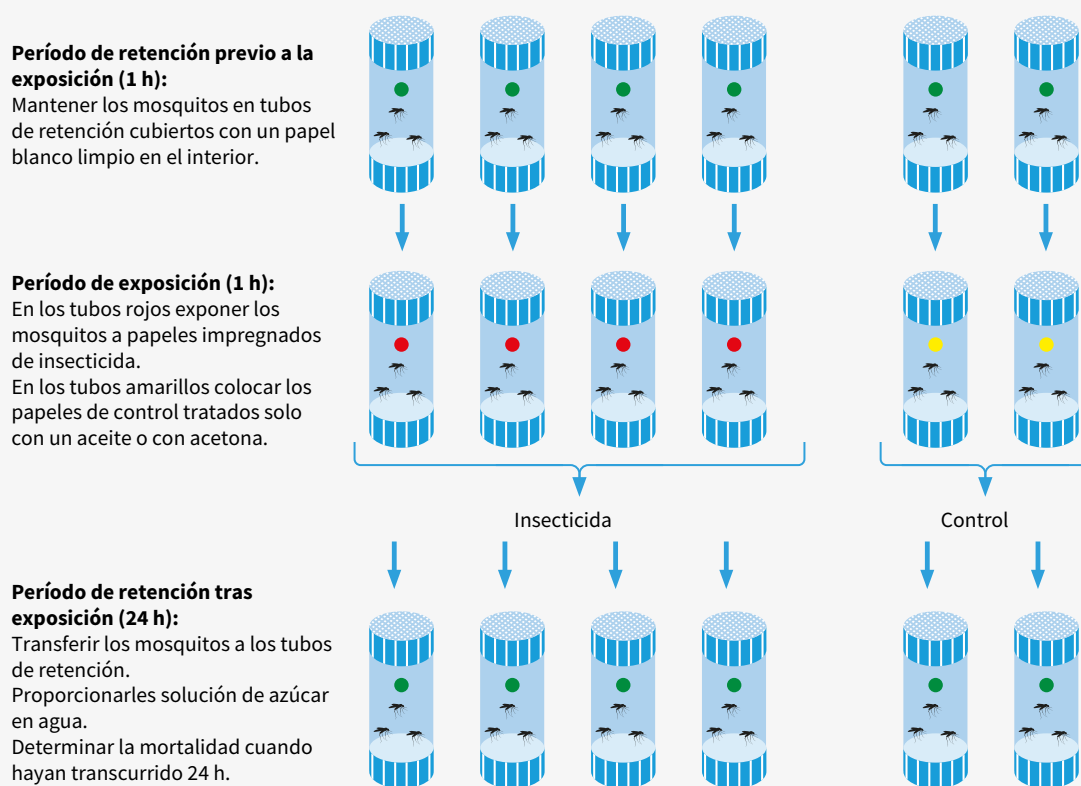
a) Etiquetado de tubos de retención (punto verde):	b) Etiquetado de tubos de control (punto amarillo):	c) Etiquetado de tubos de exposición (punto rojo)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fecha de la prueba (dd/mm/aaaa):</li> <li>• Tubo de retención n.º:</li> <li>• Iniciales del operario de la prueba:</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fecha de la prueba (dd/mm/aaaa):</li> <li>• Tubo de control n.º:</li> <li>• Control utilizado:</li> <li>• N.º de lote del papel de control:</li> <li>• Fecha de impregnación del papel (dd/mm/aaaa):</li> <li>• Fecha de caducidad del papel (dd/mm/aaaa):</li> <li>• Fecha del primer uso (dd/mm/aaaa):</li> <li>• N.º de usos anteriores del papel:</li> <li>• Iniciales del operario de la prueba:</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fecha de la prueba (dd/mm/aaaa):</li> <li>• Tubo de exposición n.º:</li> <li>• Insecticida y concentración:</li> <li>• N.º de lote del papel:</li> <li>• Fecha de impregnación (dd/mm/aaaa):</li> <li>• Fecha de caducidad (dd/mm/aaaa):</li> <li>• Fecha del primer uso (dd/mm/aaaa):</li> <li>• N.º de usos anteriores del papel:</li> <li>• Iniciales del operario de la prueba:</li> </ul>

2. Preparar los tubos de retención (punto verde).
  - 2.1 Tomar seis hojas de papel blanco limpio (12 cm × 15 cm) enrolladas en forma de cilindro e introducir una en cada uno de los seis tubos de retención. Para que las hojas se mantengan fijas contra la pared del tubo, sujetarlas con dos clips circulares de acero (uno en el extremo superior y otro en el extremo inferior).
  - 2.2 Colocar una gasa de malla de 16 hilos en cada tubo de retención y cerrar el tubo enroscando la tapa.
  - 2.3 Enroscar una unidad deslizante en el extremo abierto de cada tubo de retención, como se indica en la figura 4.
3. Preparar los tubos de control (punto amarillo).
  - 3.1 Con guantes desechables, enrollar dos papeles de control en forma de cilindro e introducir cada uno en un tubo con punto amarillo, de manera que la etiqueta rotulada en el papel quede en la cara exterior y se pueda leer a través del tubo transparente.
  - 3.2 Sujetar los papeles de control con dos clips circulares de cobre (uno en el extremo superior y otro en el extremo inferior). Cerrar el tubo con un tapón de rosca por el extremo inferior.
  - 3.3 Quitarse los guantes y desecharlos en una bolsa de residuos biológicos.

4. Preparar los tubos de exposición (punto rojo).
  - 4.1 Con guantes desechables, enrollar en forma de cilindro cuatro papeles tratados con un insecticida e introducir cada uno en un tubo con punto rojo, de manera que la etiqueta rotulada en el papel quede en la cara exterior y se pueda leer a través del tubo transparente.
  - 4.2 Sujetar los papeles tratados con insecticida con dos clips circulares de cobre (uno en el extremo superior y otro en el extremo inferior). Cerrar el tubo con un tapón de rosca por el extremo inferior.
  - 4.3 Quitarse los guantes y desecharlos en una bolsa de residuos biológicos.

## Segundo paso: Exposición de los mosquitos

**Figura 7. Etapas de la prueba en tubos de la Organización Mundial de la Salud con mosquitos adultos e insecticidas de efecto letal**



Fuente: Adaptado de Organización Mundial de la Salud. Standard operating procedure for testing insecticide susceptibility of adult mosquitoes in WHO tube tests. SOP version: WHO Tube test/01/14 January 2022. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://www.who.int/publications/i/item/9789240043831>.

5. Aspirar los mosquitos e introducirlos en los tubos: Con un aspirador, tomar 25 hembras de mosquito adultas de una jaula para mosquitos e introducir las en cada uno de los seis tubos de retención (punto verde) a través del orificio existente en la compuerta deslizante del tubo. Para llenar los seis tubos se necesitan 150 mosquitos en total. Cerrar la unidad deslizante y colocar los tubos de retención en posición vertical.
6. Dejar los mosquitos en los tubos de retención durante una hora.

7. Transferir los mosquitos de los tubos de retención a los tubos de prueba (dos tubos de control con un punto amarillo y cuatro de exposición con un punto rojo): Solo han de transferirse a los tubos de prueba los mosquitos vivos; debe retirarse todo mosquito moribundo (es decir, que no pueda volar) o muerto.
    - 7.1 Uno por uno, conectar los tubos vacíos de retención y de control a las caras que quedan libres de las unidades deslizantes de los tubos de retención.
    - 7.2 Abrir con cuidado las unidades deslizantes y, golpeando suavemente, transferir los mosquitos de los tubos de retención a los tubos de exposición.
    - 7.3 Una vez que todos los mosquitos estén en los tubos de retención, cerrar las unidades deslizantes y colocar un algodón en el orificio para taponarlas.
    - 7.4 Anotar el número exacto de mosquitos vivos expuestos. Es posible que algunos mosquitos hayan muerto durante el período de retención o el proceso de traslado.
    - 7.5 Desacoplar los tubos de retención con un punto verde de los tubos de exposición y apartarlos.
    - 7.6 Colocar los tubos en posición vertical con la malla hacia arriba. Mantenerlos en una zona con poca iluminación o cubiertos con discos de cartón para reducir la intensidad lumínica y disuadir a los mosquitos de posarse en la tapa de malla.
  8. Dejar los mosquitos en los tubos de tratamiento (punto rojo) y de control (punto amarillo) durante una hora.
  9. Transferir los mosquitos de nuevo a los tubos de retención cuando finalice el período de exposición de una hora.
    - 9.1 Golpeando suavemente, volver a introducir los mosquitos en los tubos de retención con un punto verde, siguiendo el procedimiento indicado pero en sentido inverso.
    - 9.2 Desacoplar los tubos de exposición de las unidades deslizantes.
    - 9.3 Colocar los tubos en posición vertical, con la malla hacia arriba.
    - 9.4 Depositar un algodón empapado en una solución azucarada al 10% sobre la malla de los tubos de retención.
- Procedimiento para empapar el algodón en la solución azucarada:**
- Verter un poco de solución azucarada al 10% en un recipiente limpio.
  - Tomar un algodón de 5 cm × 5 cm aproximadamente.
  - Sumergir el algodón en la solución azucarada.
  - Retirar el algodón y apretarlo un poco para que no gotee.
  - Colocar el algodón empapado en la parte superior del tubo de retención para que los mosquitos puedan alimentarse con azúcar e hidratarse.
  - Verter la solución azucarada sobrante en una pileta y enjuagar el recipiente con agua del grifo.
10. Anotar el número de mosquitos caídos (según la definición del cuadro 3).
  11. Dejar los mosquitos en los tubos de retención (punto verde) durante 24 horas a una temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y una humedad relativa del  $75\% \pm 10\%$ .

## Tercer paso: Anotar los resultados de mortalidad

12. Anotar la mortalidad 24 horas después de la hora de exposición: Contar y anotar el número de mosquitos vivos y de mosquitos muertos (cuadro 3). Anotar los datos en la ficha de registro o en el sistema electrónico de recogida de datos.

### Cuadro 3. Definiciones de la Organización Mundial de la Salud para determinar la caída y la mortalidad de los mosquitos tras la prueba

MOSQUITOS CONSIDERADOS VIVOS TRAS 1 H DE EXPOSICIÓN O 24, 48 O 72 H DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN	MOSQUITOS CONSIDERADOS CAÍDOS TRAS 1 H DE EXPOSICIÓN O MUERTOS 24, 48 O 72 H DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN
Puede mantenerse sobre las patas y volar con coordinación	<ul style="list-style-type: none"><li>• Sin señales de vida; inmóvil; no puede mantenerse sobre las patas.</li><li>• Todo mosquito que no pueda mantenerse sobre las patas (por ejemplo, porque solo tiene una o dos).</li><li>• Todo mosquito que no pueda volar con coordinación.</li><li>• Todo mosquito tendido sobre el dorso, que mueva las patas y las alas pero sea incapaz de levantar el vuelo.</li><li>• Todo mosquito que pueda mantenerse sobre las patas y levantar el vuelo pero caiga de inmediato.</li></ul>

Fuente: Organización Mundial de la Salud. Standard operating procedure for testing insecticide susceptibility of adult mosquitoes in WHO tube tests. SOP version: WHO Tube test/01/14 January 2022. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://www.who.int/publications/i/item/9789240043831>.

## Procedimiento de limpieza

Deben seguirse los pasos descritos a continuación (6):

1. Dejar en remojo toda la noche en una solución alcalina al 20% (TFD4 o Decon 90) los equipos que hayan entrado en contacto directo con el insecticida (tubos de exposición, clips de cobre, etc.) o al 10% en el caso de los equipos que, pese a no haber entrado en contacto directo, se hayan empleado para la manipulación de los mosquitos (tubos de retención, clips de acero, etc.).

*Nota: Las soluciones descontaminantes al 20% y al 10% deben renovarse una vez al mes como mínimo, o con más frecuencia si es necesario.*

2. Al día siguiente, aclarar tres veces el equipo con agua del grifo y dejar secar a temperatura ambiente.
3. Limpiar las superficies de trabajo y el equipo fijo con acetona.

# Metodología de botellas de la OMS para la evaluación de la susceptibilidad a los insecticidas

El bioensayo de la OMS en botellas es una versión modificada del método de botellas de los CDC, desarrollado con el fin de armonizar los criterios de valoración con los de la prueba de la OMS en tubos, de modo que la mortalidad de los mosquitos se evalúe tras la exposición. El bioensayo de la OMS en botellas es una prueba directa de la respuesta a la exposición mediante la cual se determina la mortalidad de los mosquitos tras una hora de exposición a una concentración estándar conocida (por ejemplo, discriminante) de un insecticida. Se registra la mortalidad de los mosquitos de la prueba 24 (o 72) h después del período de exposición de una hora (1,7).

El bioensayo en botellas fue desarrollado para permitir la evaluación de la susceptibilidad de los vectores a insecticidas que, por propiedades particulares, son inestables o no pueden ser impregnados en el papel de filtro Whatman® n.º 1. Si bien los bioensayos de la OMS en botellas se emplean con el fin de evaluar la susceptibilidad de los vectores a reguladores del crecimiento de los insectos, para determinar las propiedades esterilizantes de estos (es decir, la inhibición de la oviposición y la reducción de la fecundidad) ejecutando algunos pasos adicionales tras la exposición, no deben ser utilizados con reguladores del crecimiento de los insectos que afecten la fecundidad o la fertilidad. En el cuadro 4 se muestran las diferencias entre el de la OMS y el de los CDC (1,7).

18

**Cuadro 4. Diferencias entre los bioensayos en botellas de la Organización Mundial de la Salud y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades**

BIOENSAYO	NÚMERO DE BOTELLAS TRATADAS	NÚMERO DE BOTELLAS DE CONTROL	DURACIÓN DE LA EXPOSICIÓN	TIEMPO QUE HA DE TRANSCURRIR TRAS LA EXPOSICIÓN PARA EVALUAR LA MORTALIDAD DE LOS MOSQUITOS
Bioensayo en botellas de la OMS	4	2	1 h	24 h (o 72 h en el caso del clorfenapir)
Bioensayo en botellas de los CDC	4	1	30 min (o 45 min en el caso del DDT)	Al finalizar el período de exposición de 30 min (o 45 min en el caso del DDT)

*Notas:*

Se evalúa la susceptibilidad de los vectores a los insecticidas, salvo el piriproxifeno.

CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. DDT: dicloro difenil tricloretano. OMS: Organización Mundial de la Salud.

*Fuente:* Organización Mundial de la Salud. Manual for monitoring insecticide resistance in mosquito vectors and selecting appropriate interventions [Internet]. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/356964>.

## Materiales para el método de botellas

A continuación, se detallan los equipos y materiales necesarios para la realización del método de botellas de la OMS (1,7).

## Equipos

- Botellas Wheaton® de 250 ml con tapón de rosca: 6 botellas por cada compuesto insecticida que se vaya a evaluar (12 en el caso del clorfenapir) (si se lavan para ser reutilizados, deben limpiarse adecuadamente mediante el procedimiento de lavado de botellas que se describe más adelante).
- Espátula de pesaje
- Microbalanza (balanza electrónica)
- Agitadora vorticial (vórtex)
- Lente de aumento o lupa binocular
- 2 botellas de vidrio de color topacio (50-100 ml de volumen cada uno) (se pueden utilizar en su lugar botellas de vidrio limpias envueltas en papel de aluminio)
- Juego de micropipetas calibradas (por ejemplo, 100 µl, 200 µl y 1000 µl)
- Temporizador (cronómetro)
- Monitores de temperatura y humedad, calibrados y con registros rastreables
- Recipiente de plástico de 20 l o pileta de 20 l
- Aspiradores para recolectar los mosquitos (aparatos que funcionen con pilas para evitar la exposición a insecticidas o la inhalación de alérgenos)
- Jaulas de mosquitos (de 20 cm × 20 cm como mínimo)
- Gradillas
- Equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex)
- Cámara de prueba o insectario climatizado a  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  de temperatura y  $75\% \pm 10\%$  de humedad relativa

## Reactivos y material fungible

- Insecticida de calidad técnica (principio activo [PA]) o su solución madre
- Acetona (reactivo analítico)
- Un tensioactivo apropiado, si es necesario (por ejemplo, Mero® [éster metílico de aceite de colza al 81%, fabricado por Bayer])
- Vasos de papel para la retención de los mosquitos adultos (440 ml; 10 cm de altura × 9,5 cm de anchura) (es decir, una cámara de retención para un lote de 25 mosquitos de prueba)
- Malla estrecha en cantidad suficiente para cubrir los vasos o cuencos y bandas elásticas para sujetar los trozos de malla
- Puntas de plástico desechables para las micropipetas (por ejemplo, 100 µl, 200 µl y 1000 µl)
- Pipetas de vidrio desechables de varios volúmenes
- Algodón de calidad médica
- Solución azucarada al 10% (glucosa disuelta en agua al 10% p/v)
- Papel de aluminio
- Papel encerado para pesar el insecticida (o vasos pequeños de aluminio)
- Cinta adhesiva
- Rotuladores permanentes para etiquetar las botellas, las tapas y las pipetas
- Ficha de registro de datos (anexo 5), bolígrafos y lápices para anotar los datos
- Guantes desechables
- Acetona (para limpiar)
- Etanol (para limpiar las superficies de trabajo)
- Solución alcalina TFD4 o Decon 90 (para limpiar el equipo que entre en contacto con los compuestos químicos)

## Cría y preparación de los mosquitos para el método de botellas

El bioensayo se lleva a cabo utilizando 150 hembras de mosquito adultas, de 3 a 5 días de edad y no alimentadas con sangre. Antes de la prueba, los mosquitos han de permanecer dos horas sin alimentarse.

Durante la cría de los mosquitos, estos deben mantenerse bien alimentados y dispuestos en bandejas en las fases larvianas y en jaulas durante la fase adulta, evitando las aglomeraciones. Este último requisito es importante para reducir en lo posible la mortalidad por causas distintas de la exposición al insecticida.

Durante el período de exposición, es importante que cada frasco contenga 25 mosquitos o una cantidad similar, pero no se debe exceder esa cifra para evitar aglomeraciones y causar la muerte por causas distintas a la exposición al insecticida (1,7).

## Preparación de la solución madre de concentración discriminante

Algunos insecticidas se pueden disolver en acetona sola, pero otros suelen cristalizarse (por ejemplo, clotianidina, flupiradifurona o imidacloprid). Debido a que la absorción del insecticida cristalizado por el organismo del insecto es muy reducida, para evitar la cristalización debe añadirse un tensioactivo (por ejemplo, Mero®) a la acetona, antes de preparar la solución madre (1,7).

1. Comprobar la concentración discriminante del insecticida y el tensioactivo: En el anexo 1 se indican las concentraciones discriminantes de insecticida y las cantidades correspondientes de Mero® que se han de utilizar con distintos compuestos para *Anopheles* spp. y *Aedes* spp., respectivamente. En el anexo 6 se indica el cálculo de las cantidades de insecticida, disolvente y tensioactivo necesarias para preparar la solución madre.
2. Preparar la botella de vidrio en que se conservará la solución madre: Tomar una botella limpia de vidrio opaco (de color topacio o envuelto en papel de aluminio, si es transparente) de volumen adecuado y etiquetarlo con la concentración de la solución madre y la fecha.

## Preparación de la solución madre

Deben seguirse los pasos a continuación:

- Preparar la balanza electrónica: Colocar un trozo limpio de papel de pesaje (o un vaso pequeño de aluminio) sobre la balanza y ajustarla a cero.
- Con acetona como disolvente: Para preparar una concentración de prueba de 25 µg del principio activo (PA) para una botella de 250 ml, pesar 25 mg del PA con una espátula limpia y disolverlo por completo en 1 l de acetona (disolvente) o cualquier otra mezcla de disolvente y tensioactivo recomendado por el fabricante (por ejemplo, Mero® y acetona; véase el procedimiento indicado a continuación). También se puede preparar un volumen menor de solución madre (por ejemplo, 5 ml), introduciendo 125 µg del PA en la botella y añadiendo 5 ml de disolvente y tensioactivo. Esta solución madre contendrá 25 µg del PA por ml.
- Con acetona y Mero® (en una concentración de 1500 ppm) para la evaluación de *Aedes* spp.: Con una pipeta, extraer 0,17 ml (170 µl) de Mero® y añadirlo a 100 ml de acetona en una botella.
- Con acetona y Mero® (en una concentración de 800 ppm) para la evaluación de *Anopheles* spp. (excepto *An. albimanus*): Con una pipeta, extraer 89 µl de Mero® y añadirlo a 100 ml de acetona en una botella o, para un volumen menor, añadir 8,9 µl de Mero® a 10 ml de acetona.
- Con acetona y Mero® (en una concentración de 200 ppm) para la evaluación de *An. albimanus*: La concentración de Mero® para el bioensayo en botellas es menor en el caso de *An. albimanus* que en el de otras especies de *Anopheles* (1). Para obtener una concentración de 200 ppm, extraer con una pipeta 22 µl de Mero® y añadirlo a 100 ml de acetona en una botella de vidrio o, si se desea un volumen menor, añadir 2,2 µl de Mero® a 10 ml de acetona.



## Conservación y utilización de la solución madre

Deben seguirse los pasos a continuación (1,7):

- Mantener la botella de solución madre bien cerrada para evitar la evaporación de la acetona y conservarla en un refrigerador a 4-8 °C durante dos meses como máximo.
- Para utilizar la solución madre, sacar la botella del refrigerador, dejar que adquiera temperatura ambiente (por lo general, de 30 minutos a 1 h), extraer con una pipeta el volumen requerido, cerrar inmediatamente la botella y volver a introducirla en el refrigerador para futuros usos.

*Nota: Si la botella que contiene la solución madre se abre sin permitir que alcance la temperatura ambiente, puede condensarse vapor de agua en la botella e hidrolizar el insecticida, o puede que la solución de recubrimiento no seque por completo debido a la presencia de moléculas de agua.*

## Procedimientos de los bioensayos en botellas para evaluar la susceptibilidad de los mosquitos a los insecticidas

Deben seguirse los pasos a continuación (7):

*Nota: En el caso del clorfenapir, el procedimiento descrito a continuación debe llevarse a cabo en paralelo con las hembras de mosquito recolectadas en el campo y las procedentes de una colonia susceptible de laboratorio.*

### Primer paso: Recubrimiento del interior de las botellas

- 1. Preparar botellas limpias y secas:** Tomar la cantidad necesaria de botellas de vidrio de 250 ml con tapón de rosca, vacías y limpias, y secarlas en una estufa durante 20 minutos o al aire libre durante una o dos horas, según el grado de humedad.
- 2. Si la solución madre y el disolvente (la acetona) se han guardado en un refrigerador:** Sacar las botellas del refrigerador y dejarlas en reposo durante 30 minutos o una hora, sin quitar los tapones, para que adquieran la temperatura ambiente.
- 3. Etiquetar las botellas de exposición, las botellas de control y los tapones con el nombre y la concentración de insecticida ( $\mu\text{g}/\text{botella}$ ) y la fecha de la prueba.**
- 4. Recubrir el interior y los tapones de las botellas de control y de exposición:** Recubrir en primer lugar las botellas de control y después las botellas con insecticida. Han de recubrirse una por una, siguiendo el procedimiento que se indica a continuación y se ilustra en la figura 8.
  - 4.1** Sostener la botella en un ángulo de 45° aproximadamente, con la boca hacia arriba. Con una pipeta, añadir 1 ml de acetona a las botellas de control y 1 ml de solución madre de insecticida a las botellas de exposición. Poner el tapón a la botella y girarla sobre sí misma cinco veces como mínimo, para recubrir la base (figura 8, paso 1).
  - 4.2** Inclinar ligeramente la botella hacia abajo y girarla sobre sí misma cinco veces como mínimo, para recubrir la parte superior y el tapón (figura 8, paso 2).
  - 4.3** Inclinar la botella hacia abajo en un ángulo de 45° aproximadamente y girarla sobre sí misma cinco veces como mínimo, para recubrir el tapón y el cuello (figura 8, paso 3). Repetir los pasos 4.1 a 4.3 una vez, como mínimo.
  - 4.4** Colocar la botella en horizontal sobre una superficie plana. Hacerla rodar hacia delante y detrás 10 veces como mínimo, voltearla y hacerla rodar otras 10 veces o más para que todas las paredes queden recubiertas (figura 8, paso 4).
  - 4.5** Repetir los pasos 4.1 a 4.4 tres veces como mínimo. Colocar la botella en una campana de extracción y encenderla para que se active el ventilador extractor.
  - 4.6** Quitar el tapón de la botella para que se evapore la acetona. Colocar el tapón de la botella boca arriba dentro de la campana de extracción, de modo que su interior quede expuesto al aire.

*Nota: La evaporación de la acetona puede generar algo de presión en la botella. Se trata de un fenómeno habitual, por lo que el tapón ha de desenroscarse con cuidado.*

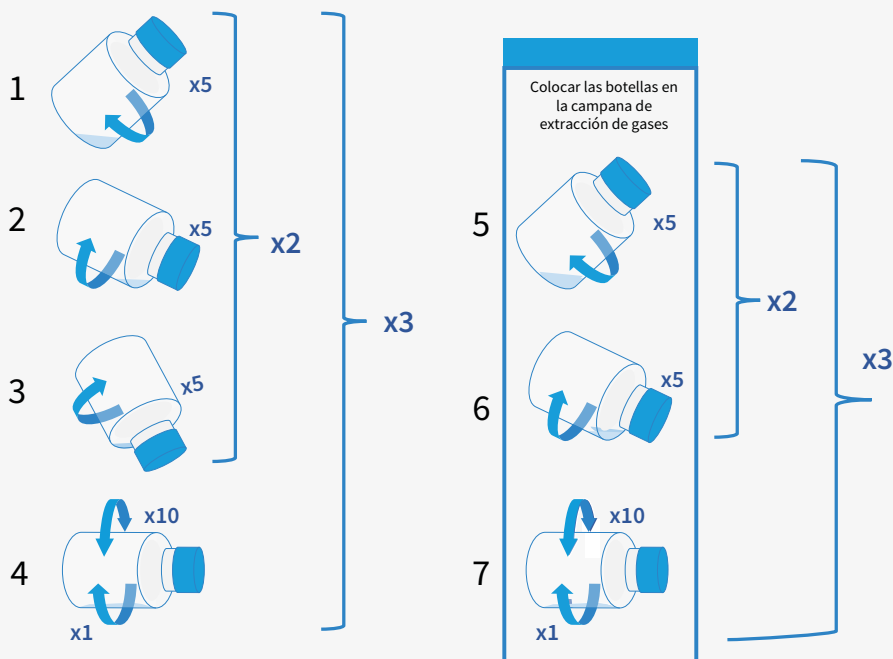
- 4.7 Sostener la botella en un ángulo de 45° aproximadamente, con el cuello hacia arriba. Hacerla girar sobre sí misma cinco veces como mínimo, para recubrir la base (figura 8, paso 5).
  - 4.8 Inclinar ligeramente la botella hacia abajo, procurando que no caiga nada del líquido remanente, y hacerla girarla sobre sí misma cinco veces como mínimo para recubrir la parte superior (figura 8, paso 6). Repetir los pasos 4.7 y 4.8 dos veces como mínimo.
  - 4.9 Colocar la botella en horizontal bajo la campana de extracción. Hacerla rodar hacia delante y detrás 10 veces como mínimo, voltearla y hacerla rodar otras 10 veces o más para que todas las paredes queden recubiertas (figura 8, paso 7).
  - 4.10 Repetir los pasos 4.7 a 4.9 tres veces como mínimo, hasta que el disolvente se haya evaporado y ya no sea visible. Sosteniendo la botella en un ángulo de 45° aproximadamente, con el cuello hacia arriba, comprobar si se acumula disolvente en la base de la botella.
- 5. Dejar secar la botella durante dos horas:** Envolver la botella en papel de aluminio para proteger el contenido de la luz. Dejar la botella abierta y el tapón bajo una campana extractora (o en una estancia aparte con ventilación), sin perturbaciones, durante dos horas. Una vez transcurrido ese período de secado, comprobar si la superficie interior de la botella está completamente seca.

*Nota: El intervalo de tiempo entre la impregnación (el recubrimiento) de las botellas y el bioensayo es de dos horas (tiempo de secado de las botellas y los tapones) y no de 24 horas, como se recomienda en el caso de otros insecticidas. La campana extractora de gases debe permanecer encendida mientras se secan las botellas y los tapones, y no debe ser utilizada o limpiada por otros operarios. Se puede limpiar el equipo y el material de vidrio (por ejemplo, pipetas) en la campana extractora, pero sin que su limpieza interfiera en el secado de la botella.*

- 6. Almacenamiento de las botellas:** Cerrar las botellas con sus tapones y depositarlas en un lugar fresco, seco y oscuro hasta su utilización.

*Nota: Al principio se puede practicar el procedimiento para recubrir uniformemente las botellas recubriendo una o más con una mezcla de acetona y algún colorante (por ejemplo, tinta).*

**Figura 8. Procedimiento para recubrir el interior de las botellas uniformemente con la acetona**



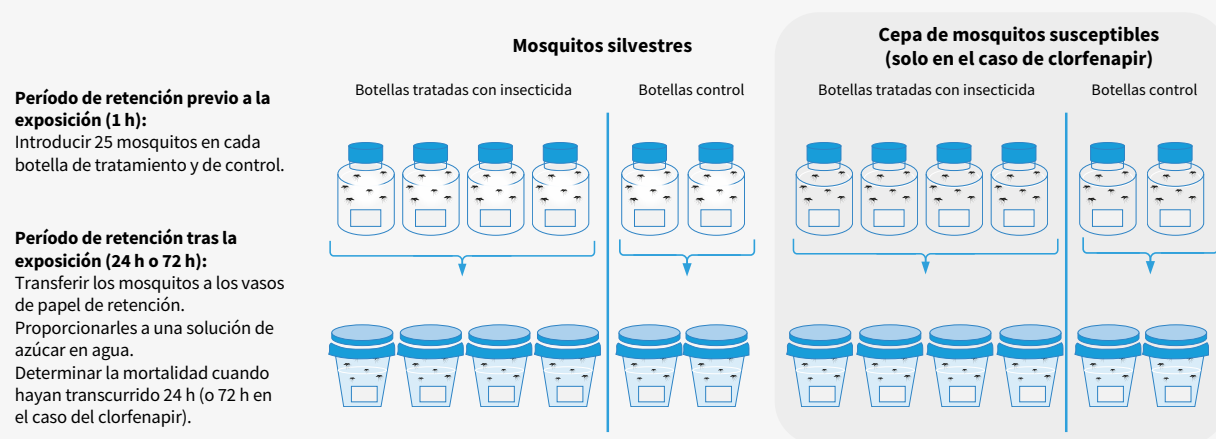
Fuente: Adaptado de Organización Mundial de la Salud. Standard operating procedure for testing insecticide susceptibility of adult mosquitoes in WHO bottle bioassays. SOP version: WHO Bottle-bioassay/01/14 January 2022. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://www.who.int/publications/i/item/9789240043770>.

## Segundo paso: Exposición de los mosquitos

- 7. Preparar las botellas para la introducción de los mosquitos:** Alinear las botellas, con los tapones enroscados, pero sin apretar, para que resulte fácil introducir los mosquitos. Colocar un trozo de malla sobre la boca de cada botella y sujetarlo con una banda elástica (figura 9).

*Nota: Las hembras de mosquito adultas, de 3 a 5 días de edad, deben haber permanecido dos horas sin alimentarse antes de la prueba.*

**Figura 9. Diagrama del proceso de exposición de los mosquitos en las botellas**



*Fuente:* Adaptado de Organización Mundial de la Salud. Standard operating procedure for testing insecticide susceptibility of adult mosquitoes in WHO bottle bioassays. SOP version: WHO Bottle-bioassay/01/14 January 2022. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://www.who.int/publications/i/item/9789240043770>.

- 8. Aspirar los mosquitos e introducirlos en las botellas:** Introducir los mosquitos en las botellas de control y después en las botellas con insecticida. Utilizar aspiradores distintos para las botellas de control y las botellas con insecticida.
  - 8.1 Empleando preferentemente un aspirador mecánico, recolectar los 25 mosquitos no alimentados con sangre que se han de introducir en cada botella.
  - 8.2 Insertar el aspirador con los 25 mosquitos en el orificio de la malla que cubre la boca de la botella. Situar la abertura del aspirador en la parte central de la botella y golpear con suavidad el aspirador para que los mosquitos pasen a la botella.
  - 8.3 Cerrar rápidamente la botella con el tapón para evitar que los mosquitos escapen.
  - 8.4 Colocar la botella en posición vertical y poner en marcha el cronómetro para medir el tiempo de exposición (una hora).
- 9. Dejar los mosquitos en exposición en la botella durante una hora.**
- 10. Durante el período de exposición, preparar los seis vasos de papel para la retención:** Colocar un trozo de malla sobre la boca de cada vaso de papel de 440 ml y sujetarlo con una banda elástica.
- 11. Transferir los mosquitos a los vasos de retención y mantenerlos durante 24 horas (72 horas en el caso del clorfenapir):**
  - 11.1 Extraer con cuidado los mosquitos de cada botella mediante succión, preferentemente con un aspirador mecánico, y transferirlos a los vasos de retención cubiertos con una malla.
  - 11.2 Colocar un algodón empapado en una solución azucarada al 10% sobre la malla.
  - 11.3 Para asegurar la uniformidad de los resultados, especialmente en el caso de compuestos con un modo de acción particular (por ejemplo, clorfenapir), mantener los vasos de tratamiento y de control estrictamente a  $27\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  de temperatura y  $75\% \pm 10\%$  de humedad relativa durante toda la prueba.
- 12. Anotar el número de mosquitos caídos:** Inmediatamente después de transferir los mosquitos a los vasos, anotar la cantidad de mosquitos caídos (según la definición del cuadro 5).

13. Anotar la mortalidad al cabo de 24 horas (72 horas en el caso del clorfenapir): Contar y anotar el número de mosquitos vivos y de mosquitos muertos (según las definiciones del cuadro 5) 24 horas después de la exposición (72 horas en el caso del clorfenapir). Anotar los datos en la ficha de registro o en el sistema electrónico de recogida de datos.

### Cuadro 5. Directrices de la OMS para determinar la caída y la mortalidad de los mosquitos tras la prueba

MOSQUITOS CONSIDERADOS VIVOS TRAS 1 H DE EXPOSICIÓN O 24, 48 O 72 H DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN	MOSQUITOS CONSIDERADOS CAÍDOS TRAS 1 H DE EXPOSICIÓN O MUERTOS 24, 48 O 72 H DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN
Puede mantenerse sobre las patas y volar con coordinación.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin señales de vida; inmóvil; no puede mantenerse sobre las patas.</li> <li>• Todo mosquito que no pueda mantenerse sobre las patas (por ejemplo, porque solo tiene una o dos).</li> <li>• Todo mosquito que no pueda volar con coordinación.</li> <li>• Todo mosquito tendido sobre el dorso, que mueva las patas y las alas pero sea incapaz de levantar el vuelo.</li> <li>• Todo mosquito que pueda mantenerse sobre las patas y levantar el vuelo pero caiga de inmediato.</li> </ul>

Fuente: Standard operating procedure for testing insecticide susceptibility of adult mosquitoes in WHO bottle bioassays. OMS, 2022

## Procedimiento de lavado de las botellas

Se indican a continuación dos posibles procedimientos de lavado de las botellas, en función de los productos de limpieza disponibles (7).

### Método genérico de lavado con Decon o TFD4

1. Quitar las etiquetas adhesivas de las botellas.
2. Añadir aproximadamente 10 ml de acetona a cada botella que se vaya a lavar y cerrarlas con el tapón.
3. Agitar las botellas enérgicamente una por una.
4. Desechar la acetona.
5. Preparar una solución de Decon al 2%-5% (o un producto equivalente, por ejemplo, detergente alcalino TFD4 al 10%) con agua caliente en un recipiente abierto o una pileta de 20 l.
6. Sumergir las botellas y los tapones enjuagados con acetona en la solución de Decon, y dejarlos así toda la noche.
7. Al día siguiente, retirar de la solución las botellas y los tapones, frotar enérgicamente cada uno de ellos con un cepillo de limpieza y la solución de Decon, y aclararlos bien tres veces con agua del grifo.
8. Mantener las botellas y los tapones sumergidos en un recipiente o una pileta con agua limpia del grifo durante 24 horas.
9. Sacar las botellas, aclararlas con agua limpia del grifo y secarlas boca abajo sobre una gradilla durante 6-8 horas o secar las botellas y los tapones en una estufa a 50 °C durante 20-30 minutos. Aumentar el tiempo de secado si queda humedad visible.

## **Procedimiento de lavado cuando no se dispone de Decon o TFD4**

1. Quitar las etiquetas adhesivas de las botellas.
2. Enjuagar las botellas con acetona (si se dispone de ella) como se ha indicado antes.
3. Preparar una solución jabonosa al 10% con agua caliente en un recipiente abierto o una pileta de 20 l.
4. Mantener las botellas y los tapones sumergidos en el agua jabonosa durante 24 horas.
5. Sacarlos del agua jabonosa y:
  - 5.1 Frotar enérgicamente cada uno de ellos con un cepillo de limpieza y la solución jabonosa, y aclararlos bien tres veces con agua del grifo;
  - 5.2 Lavarlos con agua caliente en una lavadora.
6. Mantener las botellas y los tapones sumergidos en un recipiente o una pileta con agua limpia del grifo durante 24 horas.
7. Sacar las botellas, aclararlas con agua limpia del grifo y secarlas boca abajo sobre una gradilla durante 6-8 horas o secar las botellas y los tapones en una estufa a 50 °C durante 20-30 minutos. Aumentar el tiempo de secado si quedan gotas o humedad visible en las botellas.

Para verificar la calidad del lavado y que no queden restos de insecticida en las botellas, se recomienda seleccionar algunas al azar e introducir cinco mosquitos en cada una para anotar el número de mosquitos caídos tras una hora de exposición y la mortalidad 24 horas después.

# Evaluación de la intensidad de la resistencia de los mosquitos a los insecticidas

Los bioensayos de intensidad de la OMS ayudan a determinar la intensidad de la resistencia de los mosquitos a un insecticida (intensidad de la resistencia baja, moderada o alta) una vez que se ha confirmado la resistencia en una población de vectores. Debido a que los fenotipos resistentes identificados mediante pruebas con la dosis discriminante no ofrecen necesariamente información sobre la pérdida de eficacia del insecticida durante su uso en campo, es importante realizar pruebas de susceptibilidad de mosquitos adultos a ciertos insecticidas usando concentraciones cinco (5×) y diez (10×) veces mayores que la dosis discriminante (1,2).

En los bioensayos de intensidad de la OMS se siguen los mismos procedimientos utilizados en los bioensayos de susceptibilidad a dosis discriminantes, pero la evaluación es escalonada; es decir, las muestras de mosquitos se exponen a concentraciones crecientes del insecticida (1×, 5× y 10×). En los bioensayos de intensidad se compara la mortalidad de los mosquitos tras la exposición a esas concentraciones sucesivas del insecticida aplicando el algoritmo presentado en la figura 1. Los bioensayos de intensidad deben realizarse mediante la prueba en tubos de la OMS o el bioensayo en botellas de los CDC, debido a que el bioensayo en botellas de la OMS aún no ha sido validado para dicho análisis. De momento, solo pueden adquirirse papeles impregnados con múltiplos (5× y 10×) de la concentración discriminante de insecticidas piretroides (1).

# Bioensayos de la OMS con un insecticida y un sinergista

El butóxido de piperonilo (BOP) es un sinergista que se utiliza actualmente en varios productos para la lucha antivectorial precalificados por la OMS, como son los mosquiteros con piretroides y algunos productos para la nebulización. Los bioensayos de la OMS con un insecticida y un sinergista ayudan a determinar la capacidad de un sinergista para restablecer la susceptibilidad de los mosquitos a un insecticida al que sean resistentes (1,8).

Un sinergista no es un insecticida, es un compuesto que inhibe la actividad de ciertas enzimas que detoxifican los insecticidas en el organismo del insecto. Este bioensayo permite evaluar de manera indirecta la implicación de las monooxigenasas en la transmisión de la resistencia a los piretroides, y sus resultados pueden ayudar a adoptar decisiones acerca de la instalación de mosquiteros con piretroides-BOP (1,8).

Se trata de una prueba directa de la respuesta a la exposición de poblaciones de mosquitos vectores que presenten resistencia confirmada a piretroides, mediante la cual se compara la mortalidad de los mosquitos de un grupo tras la exposición a un insecticida piretroide con la mortalidad de los mosquitos de otro grupo tras la exposición a papeles tratados con BOP al 4% seguida de una exposición al mismo piretroide. Con el objetivo de determinar en qué medida puede restablecer el BOP la susceptibilidad de los mosquitos a los piretroides, este bioensayo se realiza con papeles impregnados con piretroides que sean utilizados o se vayan a utilizar para el rociado residual intradomiciliario o el tratamiento de mosquiteros sobre el terreno (1,8).

La OMS ha fijado en el 4% la concentración discriminante de BOP para bioensayos con mosquitos *Anopheles*. Aún no se han establecido concentraciones discriminantes para determinar la capacidad del BOP de restaurar la susceptibilidad de *Aedes* spp. u otros vectores a los piretroides. Si bien este procedimiento es similar a los bioensayos de susceptibilidad de la OMS, presenta las siguientes diferencias (1,8):

En cada ensayo se utilizan cuatro tubos en lugar de seis:

- Uno para la exposición al sinergista solo.
- Uno para la exposición al insecticida solo.
- Uno para la exposición al sinergista seguido del insecticida.
- Uno para el control.

## Materiales para el bioensayo en tubos con insecticida y sinergista

A continuación, se presentan los materiales necesarios para la realización de los bioensayos en tubos de la OMS con insecticida y sinergista (1,8).

## **Equipos, reactivos y material fungible**

El equipo necesario para este bioensayo es reutilizable y los papeles impregnados se deben utilizar seis veces como máximo (8).

El kit estándar de la Universidad de Ciencias de Malasia (USM) para realizar pruebas diagnósticas con mosquitos (adultos) consta de los siguientes elementos:

- 6 tubos de retención (con un punto verde)
- 2 tubos de exposición de los controles (con un punto amarillo)
- 4 tubos de exposición (con un punto rojo)
- 6 clips circulares de acero para sujetar los papeles blancos en los tubos de retención
- 6 clips circulares de cobre para sujetar los papeles impregnados de insecticida o de aceite (control) en los tubos de exposición
- 6 unidades deslizantes
- 40 hojas de papel blanco de 15 cm × 12 cm para cubrir el interior de los tubos de retención
- 2 aspiradores con tubo de vidrio (rectos)
- 2 tubos de goma de 60 cm de longitud
- 2 boquillas de vidrio para los aspiradores
- 1 rollo de cinta adhesiva
- 1 etiqueta
- Papeles impregnados: cada caja contiene 8 hojas de papel impregnado de insecticida (concentraciones discriminantes estándar en el anexo 1)
- Papeles de control: cada caja contiene 8 hojas de papel impregnado de aceite transportador para utilizar como control

## **Insumos complementarios**

- Trozos de malla
- 1 jaula para contener las hembras de mosquito (400 hembras a ser posible)
- 40 hojas de papel blanco de 15 cm × 12 cm para cubrir el interior de los tubos de retención
- 6 hojas de papel blanco limpio (12 cm × 15 cm)
- 1 aspirador bucal o mecánico
- Glucosa para preparar una solución acuosa azucarada al 10% (p/v)
- Algodón de calidad médica
- Temporizador (cronómetro)
- Formularios para registro de datos (anexo 7), bolígrafos y lápices para anotar los datos
- Monitores o registradores de datos de temperatura y humedad, calibrados y de registros rastreables
- Rotuladores permanentes para etiquetar los tubos
- Cámara de prueba o insectario climatizado a  $27\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  de temperatura y  $75\% \pm 10\%$  de humedad relativa
- Equipo de protección personal (p. ej., bata de laboratorio y guantes de látex)
- Acetona o alcohol (para limpiar el material de vidrio y la mesa de trabajo)
- Limpiador antibacteriano, como isopropanol o etanol al 70%

## **Mosquitos**

Para este procedimiento se requieren 400 hembras de mosquito adultas de 3 a 5 días de edad y no alimentadas con sangre, que antes de la prueba deben permanecer dos horas sin alimentarse. La muestra total se divide en cuatro grupos de 100 mosquitos cada uno:



- **Grupo de control:** se expondrá a papeles impregnados con un aceite transportador.
- **Grupo “Solo BOP”:** se expondrá únicamente a papeles impregnados con BOP.
- **Grupo “Solo insecticida”:** se expondrá únicamente a papeles impregnados con un insecticida.
- **Grupo “BOP + insecticida”:** primero se expondrá a papeles impregnados con BOP y luego a papeles impregnados con un insecticida.

Un requisito importante para evitar la mortalidad de los mosquitos por diferentes causas no relacionadas con la exposición a insecticidas o sinergistas es que, durante la cría, los mosquitos sean bien alimentados y mantenidos sin aglomeraciones en jaulas (y en bandejas durante las fases larvarias).

## Procedimientos para determinar la capacidad del butóxido de piperonilo para restablecer la susceptibilidad a los insecticidas piretroides mediante pruebas en tubos

A continuación, se describen los pasos a seguir para llevar a cabo las pruebas para determinar la capacidad del BOP de restablecer la susceptibilidad de los mosquitos adultos a los insecticidas piretroides mediante pruebas en tubos de la OMS (8).

### Primer paso: Etiquetado y preparación de los tubos

Los tubos usados para este bioensayo son los mismos que para las pruebas de susceptibilidad, con los cuales se procede de la siguiente forma:

- En los tubos de retención (identificados con un punto verde) se introduce un papel blanco limpio.
- En los tubos de control (identificados con un punto amarillo) se introduce un papel de filtro tratado con aceite o acetona.
- En los tubos de exposición (identificados con un punto rojo) se introduce un papel de filtro tratado con un insecticida y con BOP.

#### **Etiquetado de tubos:**

- Etiquetado de tubos de retención (punto verde):
  - Fecha de la prueba (dd/mm/aaaa):
  - Tubo de retención n.º:
  - Grupo de prueba:
  - Iniciales del operario de la prueba:
- Etiquetado de tubos de control (punto amarillo):
  - Fecha de la prueba (dd/mm/aaaa):
  - Tubo de control n.º:
  - Grupo de prueba:
  - Control utilizado:
  - N.º de lote del papel de control:
  - Fecha de impregnación del papel (dd/mm/aaaa):
  - Fecha de caducidad del papel (dd/mm/aaaa):
  - Fecha del primer uso (dd/mm/aaaa):
  - N.º de usos anteriores del papel:
  - Iniciales del operario de la prueba:
- Etiquetado de tubos de exposición al piretroide (punto rojo):
  - Fecha de la prueba (dd/mm/aaaa):
  - Tubo de exposición n.º:
  - Grupo de prueba:

- Insecticida y concentración:
  - N.º de lote del papel:
  - Fecha de impregnación (dd/mm/aaaa):
  - Fecha de caducidad (dd/mm/aaaa):
  - Fecha del primer uso (dd/mm/aaaa):
  - N.º de usos anteriores del papel:
  - Iniciales del operario de la prueba:
- d. Etiquetado de tubos de exposición al BOP (punto rojo):**
- Fecha de la prueba (dd/mm/aaaa):
  - Tubo de exposición n.º:
  - Grupo de prueba:
  - Sinergista y concentración:
  - N.º de lote del papel:
  - Fecha de impregnación del papel (dd/mm/aaaa):
  - Fecha de caducidad de los papeles (dd/mm/aaaa):
  - Fecha del primer uso de los papeles (dd/mm/aaaa):
  - N.º de usos anteriores del papel:
  - Iniciales del operario de la prueba:

### **Preparación de los tubos**

#### **1. Preparar los tubos de retención (punto verde)**

- 1.1 Tomar cuatro hojas de papel blanco limpio (12 cm × 15 cm) enrolladas en forma de cilindro e introducir una en cada uno de los cuatro tubos de retención. Para que las hojas se mantengan fijas contra la pared del tubo, sujetarlas con dos clips circulares de acero (uno en el extremo superior y otro en el extremo inferior).
- 1.2 Colocar una gasa de malla de 16 hilos en cada tubo de retención y cerrar el tubo enroscando la tapa.
- 1.3 Enroscar una unidad deslizante en el extremo abierto de cada tubo de retención.

#### **2. Preparar los tubos de control (punto amarillo)**

- 2.1 Con unos guantes desechables puestos, enrollar un papel de control en forma de cilindro e introducirlo en un tubo con punto amarillo, de manera que la etiqueta rotulada en el papel quede en la cara exterior y se pueda leer a través del tubo transparente.
- 2.2 Sujetar el papel de control con dos clips circulares de cobre (uno en el extremo superior y otro en el extremo inferior).
- 2.3 Colocar una gasa de malla de 16 hilos en cada tubo de retención y cerrar el tubo enroscando la tapa.
- 2.4 Quitarse los guantes y desecharlos en una bolsa de residuos biológicos.

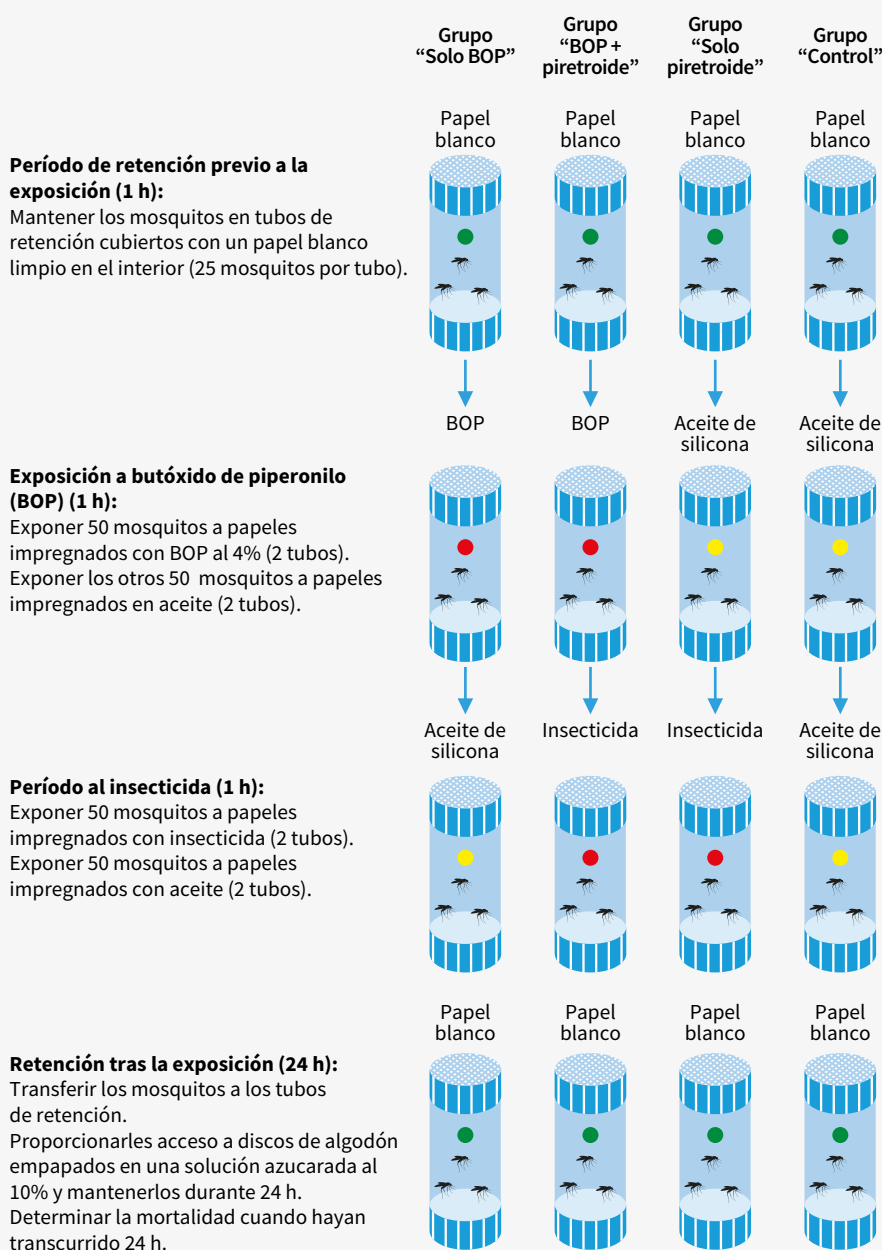
#### **3. Preparar los tubos de exposición (punto rojo)**

- 3.1 Con unos guantes desechables puestos, enrollar dos papeles impregnados con el sinergista y dos papeles impregnados con un insecticida en forma de cilindro e introducir cada uno en un tubo con punto rojo, de manera que la etiqueta rotulada en el papel quede en la cara exterior y se pueda leer a través del tubo transparente.
- 3.2 Sujetar los papeles impregnados con dos clips circulares de cobre (uno en el extremo superior y otro en el extremo inferior).
- 3.3 Colocar una gasa de malla de 16 hilos en cada tubo de retención y cerrar el tubo enroscando la tapa.
- 3.4 Quitarse los guantes y desecharlos en una bolsa de residuos biológicos.

## Segundo paso: Exposición de los mosquitos

Nota: El procedimiento de exposición que se indica a continuación debe llevarse a cabo cuatro veces, de modo que se sometan a la prueba 100 mosquitos en cada grupo. Antes de comenzar la prueba, comprobar que cada papel se pueda utilizar al menos cuatro veces más o preparar el cambio de los papeles de los tubos entre una tanda y otra (figura 10).

**Figura 10. Etapas del bioensayo con un insecticida y un sinergista**



Fuente: Adaptado de Organización Mundial de la Salud. Standard operating procedure for determining the ability of PBO to restore susceptibility of adult mosquitoes to pyrethroid insecticides in WHO tube tests. WHO SOP version: PBO-insecticide synergist bioassay/01/14 January 2022. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://www.who.int/publications/i/item/9789240043855>.

- 4. Aspirar los mosquitos e introducirlos en los tubos de retención:** Con un aspirador, tomar 25 hembras de mosquito adultas de una jaula para mosquitos e introducir las en cada uno de los cuatro tubos de retención (punto verde) a través del orificio existente en la compuerta deslizante del tubo. Para llenar los cuatro tubos de retención se necesitan 100 mosquitos en total. Cerrar la unidad deslizante y colocar los tubos de retención en posición vertical.
- 5. Dejar los mosquitos en los tubos de retención durante una hora.**
- 6. Transferir los mosquitos de los tubos de retención a los tubos con BOP o de control:** Solo han de transferirse los mosquitos vivos; debe retirarse todo mosquito moribundo (es decir, que no pueda volar) o muerto.
  - 6.1 Uno por uno, conectar los dos tubos que contienen un papel impregnado de BOP y están etiquetados como “Solo BOP” y “BOP + piretroide” y los dos tubos con papeles impregnados de aceite de silicona etiquetados como “Solo piretroide” y “Control” a las caras que quedan libres de las unidades deslizantes de los tubos de retención.
  - 6.2 Abrir con cuidado las unidades deslizantes y, golpeando suavemente, transferir los mosquitos de los tubos de retención a los tubos de exposición.
  - 6.3 Una vez que todos los mosquitos estén en los tubos con BOP o aceite de silicona, cerrar las unidades deslizantes y colocar un algodón en el orificio para taponarlas.
  - 6.4 Desacoplar los tubos de retención vacíos.
  - 6.5 Anotar el número exacto de mosquitos vivos expuestos en cada tubo. Es posible que algunos mosquitos hayan muerto durante el período de retención o el proceso de traslado.
- 7. Dejar los mosquitos en los tubos durante una hora.**
- 8. Transferir los mosquitos de los tubos con BOP o de control a los tubos con insecticida o de control:** Solo han de transferirse los mosquitos vivos; debe retirarse todo mosquito moribundo (es decir, que no pueda volar) o muerto.
  - 8.1 Conectar el tubo con un punto rojo que contiene un papel impregnado de insecticida y está etiquetado como “BOP + piretroide” al extremo libre del tubo con un papel impregnado de BOP y etiquetado como “BOP + piretroide”.
  - 8.2 Conectar el tubo con un punto amarillo que contiene un papel impregnado de aceite de silicona y está etiquetado como “Solo BOP” al extremo libre del tubo con un papel impregnado de BOP y también etiquetado como “Solo BOP”.
  - 8.3 Conectar el tubo con un punto rojo que contiene un papel impregnado de insecticida y está etiquetado como “Solo piretroide” al extremo libre del tubo con un papel impregnado de aceite de silicona y etiquetado como “Solo piretroide”.
  - 8.4 Conectar el tubo con un punto amarillo que contiene un papel impregnado de aceite de silicona y está etiquetado como “Control” al extremo libre del tubo con un papel impregnado de aceite de silicona y etiquetado como “Control”.
  - 8.5 Abrir con cuidado las unidades deslizantes y, golpeando suavemente, transferir los mosquitos de los tubos con BOP o aceite de silicona a los tubos con insecticida o a los nuevos tubos con aceite de silicona.
  - 8.6 Una vez que todos los mosquitos estén en los nuevos tubos, cerrar las unidades deslizantes y colocar un algodón en el orificio para taponarlas.
  - 8.7 Desacoplar los tubos con BOP o aceite de silicona vacíos.
  - 8.8 Anotar el número exacto de mosquitos vivos expuestos. Es posible que algunos mosquitos hayan muerto durante el período de retención o el proceso de traslado.
- 9. Dejar los mosquitos en los tubos durante una hora.**
- 10. Transferir los mosquitos de nuevo a los tubos de retención cuando finalice el período de exposición de una hora.**
  - 10.1 Conectar los cuatro tubos con un punto verde a cada uno de los tubos con mosquitos.
  - 10.2 Golpeando suavemente, volver a introducir los mosquitos en los tubos de retención con un punto verde.
  - 10.3 Separar los tubos con insecticida o aceite de silicona de las unidades deslizantes.
  - 10.4 Colocar los tubos en posición vertical con la malla hacia arriba.

10.5 Depositar un algodón empapado en una solución azucarada al 10% sobre la malla de los tubos de retención. A continuación, se describe el procedimiento para empapar el algodón en la solución azucarada:

- Verter un poco de solución azucarada al 10% en un recipiente limpio.
- Tomar un algodón de 5 cm × 5 cm aproximadamente.
- Sumergir el algodón en la solución azucarada al 10%.
- Retirar el algodón y apretarlo un poco para que no gotee.
- Colocar el algodón empapado en la parte superior del tubo de retención para que los mosquitos puedan alimentarse con azúcar e hidratarse.
- Verter la solución azucarada sobrante en una piletta y enjuagar el recipiente con agua del grifo.

11. **Anotar el número de mosquitos caídos** (según la definición del cuadro 5).

12. Dejar los mosquitos en los tubos de retención (punto verde) durante 24 horas a una temperatura de 27 °C ± 2 °C y una humedad relativa del 75% ± 10%.

### Tercer paso: Anotar los resultados de mortalidad

13. **Anotar la mortalidad 24 horas después de la exposición:** Contar y anotar el número de mosquitos vivos y de mosquitos muertos 24 horas después de la exposición (según las definiciones del cuadro 6). Anotar los datos en la ficha de registro o en el sistema electrónico de recogida de datos.

**Cuadro 6. Definiciones de la OMS de caída y mortalidad de los mosquitos tras la prueba**

MOSQUITOS CONSIDERADOS VIVOS TRAS 1 H DE EXPOSICIÓN O 24 H DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN	MOSQUITOS CONSIDERADOS CAÍDOS TRAS 1 H DE EXPOSICIÓN O MUERTOS 24 H DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN
Puede mantenerse sobre las patas y volar con coordinación.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sin señales de vida; inmóvil; no puede mantenerse sobre las patas.</li> <li>Todo mosquito que no pueda mantenerse sobre las patas (por ejemplo, porque solo tiene una o dos).</li> <li>Todo mosquito que no pueda volar con coordinación.</li> <li>Todo mosquito tendido sobre el dorso, que mueva las patas y las alas pero sea incapaz de levantar el vuelo.</li> <li>Todo mosquito que pueda mantenerse sobre las patas y levantar el vuelo pero caiga de inmediato.</li> </ul>

*Fuente:* Standard operating procedure for determining the ability of PBO to restore susceptibility of adult mosquitoes to pyrethroid insecticides in WHO tube tests. OMS, 2022.

## Procedimiento de limpieza de los tubos

Deben seguirse los pasos a continuación (8):

1. Dejar en remojo toda la noche en una solución alcalina al 20% (TFD4 o Decon 90) el equipo que haya estado en contacto directo con el insecticida (tubos de exposición, clips de cobre, etc.) o al 10% el equipo utilizado para la manipulación y retención de los mosquitos (tubos de retención, clips de acero, etc.).

*Nota:* Las soluciones descontaminantes al 20% y al 10% deben renovarse una vez al mes como mínimo, o con más frecuencia si es necesario.

2. Al día siguiente, aclarar tres veces el equipo con agua del grifo y dejar secar a temperatura ambiente.

3. Limpiar las superficies de trabajo y el equipo fijo con acetona.

# Bioensayos en botellas de la OMS para evaluar las propiedades esterilizantes del piriproxifeno en hembras de mosquito

Los análogos de hormonas juveniles, como el piriproxifeno, se utilizan para la lucha contra los vectores con el fin de inhibir o reducir la fertilidad y la fecundidad de las hembras de mosquito adultas, dando lugar a una disminución de la densidad de la siguiente generación de vectores (la descendencia). El objetivo del bioensayo de susceptibilidad es determinar la reducción de la tasa de oviposición en hembras de mosquito adultas que han sido expuestas durante una hora a una concentración estándar conocida (por ejemplo, concentración discriminante) o a concentraciones seriadas de piriproxifeno (1,9).

## Materiales del bioensayo en botellas para evaluación de piriproxifeno

A continuación, se detallan los equipamientos y materiales para llevar a cabo la evaluación de las propiedades esterilizantes del piriproxifeno en hembras de mosquito adultas mediante bioensayos en botellas de la OMS (9).

34

### Equipamiento

- Botellas Wheaton® de 250 ml con tapón de rosca (16 botellas) (si se reutilizan, deben ser lavados adecuadamente)
- Espátula de pesaje
- Microbalanza
- Agitadora vorticial (vórtex)
- Lente de aumento o lupa binocular
- 2 botellas de vidrio de color topacio (50-100 ml de volumen) (se pueden utilizar en su lugar botellas de vidrio limpias envueltas en papel de aluminio)
- Juego de micropipetas calibradas (por ejemplo, 100 µl, 200 µl y 1000 µl)
- Temporizador (cronómetro)
- Recipiente de plástico de 20 l o pileta de 20 l
- Aspiradores para recolectar los mosquitos (utilizar aparatos con pilas para evitar la posible exposición a insecticidas)
- Jaulas de mosquitos (de 20 cm × 20 cm como mínimo)
- Gradillas
- Equipo de protección personal

## Insumos complementarios

- Insecticida de calidad técnica o solución madre
- Acetona (reactivo analítico)
- Vasos de papel para la retención de los mosquitos adultos (440 ml; 10 cm de altura × 9,5 cm de anchura) (cámara de almacenamiento para un lote de 25 mosquitos de prueba)
- Vasos de papel para la retención de los mosquitos individuales (100 ml de capacidad; 6 cm de altura × 6 cm de anchura) (cámara de almacenamiento para un mosquito de prueba)
- Malla estrecha en cantidad suficiente para cubrir los vasos de papel y bandas elásticas para sujetar los trozos de malla en los vasos
- Jeringas graduadas (10-30 ml)
- Puntas de plástico desechables para las micropipetas (por ejemplo, 100 µl, 200 µl y 1000 µl)
- Pipetas pasteur de vidrio de varios volúmenes para contar y retirar las larvas de los vasos de papel
- Agua desionizada
- Algodón de calidad médica
- Contadores manuales
- Paños y papel absorbente de laboratorio
- Solución azucarada al 10% (glucosa disuelta en agua al 10% p/v)
- Papel de aluminio
- Cinta adhesiva
- Rotuladores permanentes para etiquetar las botellas, las tapas y las pipetas
- Ficha de registro de datos (anexo 8), bolígrafos y lápices para anotar los datos
- Guantes desechables
- Limpiador antibacteriano, como isopropanol o etanol al 70%
- TFD4 o Decon 90 (para limpiar el equipo en contacto con los compuestos químicos)

## Cría y preparación de los mosquitos del bioensayo en botellas para evaluación de piriproxifeno

Los bioensayos deben llevarse a cabo tanto con las hembras de mosquito recolectadas en el campo como con las procedentes de una colonia susceptible de laboratorio (200 de cada población como mínimo).

El criterio principal de valoración de esta prueba es la cuantificación de la inhibición de la oviposición de las hembras, que se determina siete días después de haberlas expuesto al piriproxifeno impregnado en botellas de vidrio (1,9).

A diferencia de las pruebas de la OMS en tubos y en botellas para otros insecticidas, es imprescindible que las hembras de mosquito se inseminen (o apareen) y que sean alimentadas con sangre antes de ser expuestas al piriproxifeno, y que además sean mantenidas con vida durante el período de siete días posterior a la exposición y las manipulaciones (1,9).

Para lograr la máxima inseminación posible y producir mosquitos capaces de sobrevivir durante todo el período de prueba, es fundamental (1,9):

- Mantener a los mosquitos bien alimentados y sin aglomeraciones en la fase larvaria y la fase adulta para reducir la mortalidad de los controles durante la prueba;
- Mezclar las hembras de mosquito adultas de la prueba con gran cantidad de machos vigorosos en los días previos a la alimentación con sangre y la prueba con el insecticida; y
- Utilizar hembras de cinco a siete días de edad alimentadas con sangre para evitar la mortalidad de los controles durante la prueba y aumentar la oviposición tras los bioensayos.

## Preparación de la solución madre de concentración discriminante

La OMS en 2022 adoptó una concentración discriminante de 100 µg de piriproxifeno (principio activo) por botella para *Anopheles gambiae* s.s., *An. funestus* s.s. y *An. stephensi* (1). Aún no se han establecido las concentraciones discriminantes para otras especies de vectores (1,9).

En el anexo 6 se indica el cálculo de la cantidad de insecticida (principio activo) y de disolvente (acetona) para la preparación de la solución madre.

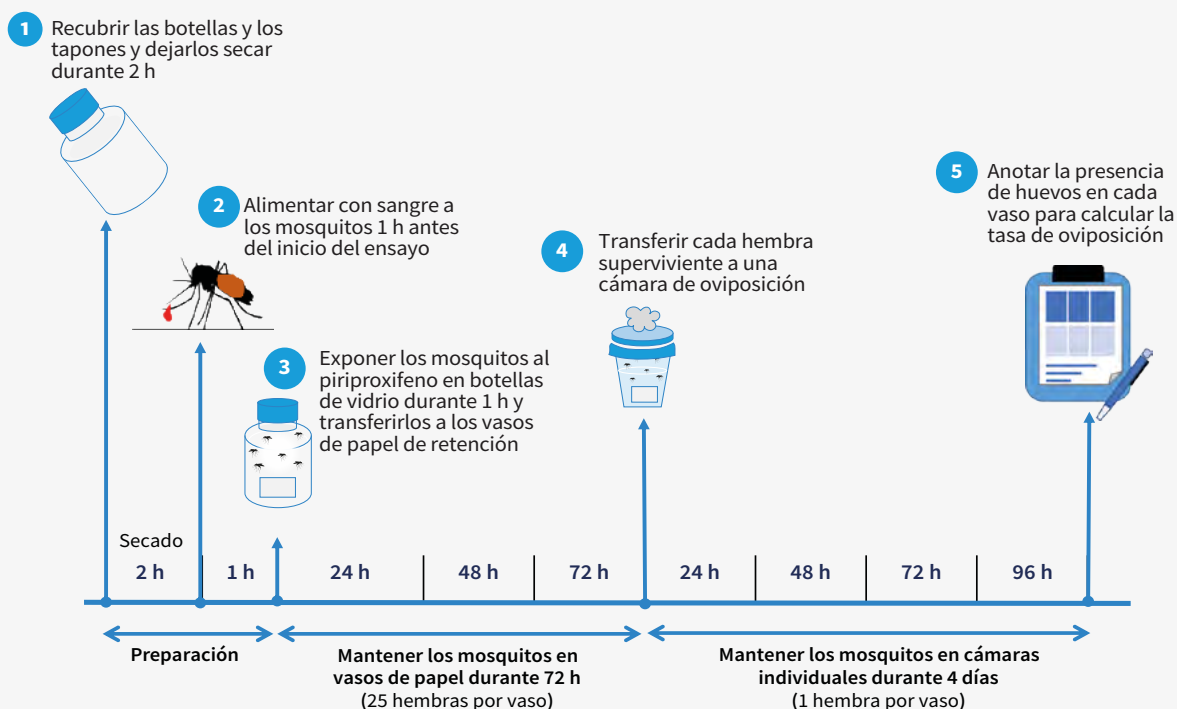
- a.** Preparar la balanza electrónica: Colocar un trozo limpio de papel de pesaje sobre la balanza y ajustarla a cero.
- b.** Preparar la botella que contendrá la solución madre:
  - Tomar una botella limpia de vidrio opaco (de color topacio o envuelto en papel de aluminio, si es transparente) del tamaño adecuado.
  - Etiquetarla con la concentración de la solución madre y la fecha.
- c.** Preparar la solución madre:
  - Para preparar una concentración de prueba de 100 µg del principio activo para una botella de bioensayo de 250 ml (con un grado hipotético de pureza del 100%), es necesario pesar 10 mg del principio activo con una espátula limpia y disolverlo por completo en 100 ml de acetona.
  - También se puede preparar un volumen menor de solución madre (por ejemplo, 10 ml) añadiendo 1 mg del principio activo a 10 ml de acetona. Esta solución madre contendrá 100 µg del principio activo por ml.
- d.** Almacenar la solución madre: La solución debe conservarse en un refrigerador a 4-8 °C durante dos meses como máximo.



## Procedimientos para el bioensayo en botellas para evaluación de piriproxifeno

En la figura 11 se presenta un diagrama con las distintas etapas del procedimiento. Dichas etapas deben llevarse a cabo en paralelo con los mosquitos capturados en el medio silvestre y con los de una colonia de mosquitos susceptibles. En el cuadro 7 se presentan las condiciones necesarias para la realización de la prueba (9).

**Figura 11. Etapas del ensayo en botellas de la Organización Mundial de la Salud para evaluar la susceptibilidad de mosquitos adultos al piriproxifeno, un regulador del crecimiento de los insectos**



Fuente: Adaptado de Organización Mundial de la Salud. Manual for monitoring insecticide resistance in mosquito vectors and selecting appropriate interventions [Internet]. Ginebra: OMS; 2022 [citado el 12 de septiembre del 2022]. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/356964>.

**Cuadro 7. Condiciones de la prueba y número de individuos necesarios para evaluar la susceptibilidad de los mosquitos silvestres a una concentración discriminante de piriproxifeno mediante bioensayos en botellas de la Organización Mundial de la Salud**

GRUPO DE PRUEBA	CONDICIONES DE LOS BIOENSAYOS EN BOTELLA				
	TIEMPO DE SECADO DE LA BOTELLA TRAS EL RECUBRIMIENTO	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	N.º DE BOTELLAS POR CONCENTRACIÓN O CONTROL <sup>a</sup>	N.º DE MOSQUITOS POR BOTELLA	N.º TOTAL DE HEMBRAS DE MOSQUITO EXPUESTAS
Mosquitos silvestres expuestos a la CD (100 µg de PA/botella)	2 h	1 h	4	25	100
Mosquitos silvestres de control (expuestos solo a la acetona)	2 h	1 h	4	25	100
Colonia susceptible expuesta a la CD (100 µg de PA/botella)	2 h	1 h	4	25	100
Mosquitos susceptibles de control (expuestos solo a la acetona)	2 h	1 h	4	25	100

Notas:

- <sup>a</sup> El número de botellas de control ha de ser el mismo que el número de botellas tratadas (es decir, cuatro), a diferencia de otros bioensayos de susceptibilidad en los que solo se necesitan dos.  
 CD: concentración discriminante. PA: principio activo.

Fuente: Organización Mundial de la Salud. Manual for monitoring insecticide resistance in mosquito vectors and selecting appropriate interventions [Internet]. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/356964>.

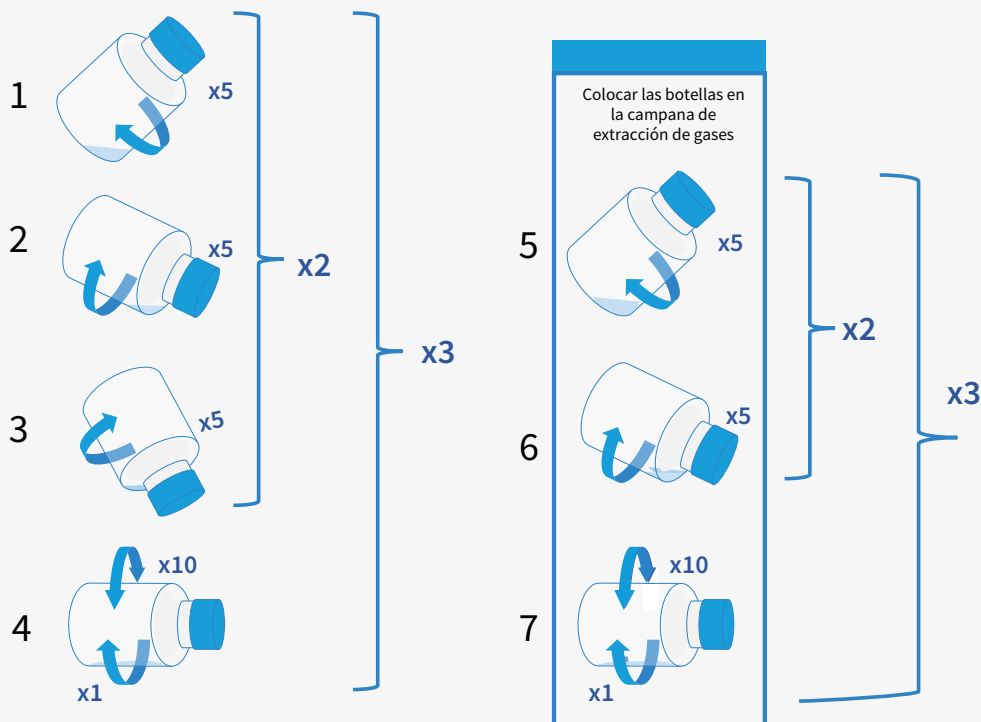
### Primer paso: Recubrimiento del interior de las botellas

1. Preparar botellas limpias y secas: tomar 16 botellas de vidrio de 250 ml con tapón de rosca, vacías y limpias, y secarlas en una estufa durante 20 minutos o al aire libre durante una o dos horas, según el grado de humedad ambiental.
2. Si la solución madre y el disolvente (la acetona) se han guardado en un refrigerador, dejar que alcancen la temperatura ambiente: Sacarlos del refrigerador y dejarlos en reposo durante una hora, sin quitar los tapones de los recipientes, para que adquieran la temperatura ambiente.
3. Etiquetar las botellas y los tapones con el nombre, la concentración de insecticida (µg/botella) y la fecha de la prueba.
4. Recubrir el interior y los tapones de las botellas de control y de exposición: Recubrir en primer lugar las botellas de control y después las botellas con piriproxifeno. Han de recubrirse una por una, siguiendo el procedimiento que se indica a continuación y se ilustra en la figura 12.
  - 4.1 Sostener la botella en un ángulo de 45° aproximadamente, con la boca hacia arriba. Añadir 1 ml de acetona a las botellas de control y 1 ml de solución madre de piriproxifeno a las botellas de exposición. Poner el tapón a la botella y girarla sobre sí misma cinco veces como mínimo, para recubrir la base (figura 12, paso 1).
  - 4.2 Inclinar ligeramente la botella hacia abajo y girarla sobre sí misma cinco veces como mínimo, para recubrir la parte superior y el tapón (figura 12, paso 2).
  - 4.3 Inclinar la botella hacia abajo en un ángulo de 45° aproximadamente y girarla sobre sí misma cinco veces como mínimo, para recubrir el tapón y el cuello (figura 12, paso 3). Repetir los pasos 4.1 a 4.3 una vez, más como mínimo.
  - 4.4 Colocar la botella en horizontal sobre una superficie plana. Hacerla rodar hacia delante y detrás 10 veces como mínimo, voltearla y hacerla rodar otras 10 veces o más para que todas las paredes queden recubiertas (figura 12, paso 4).

- 4.5 Repetir los pasos 4.1 a 4.4 tres veces como mínimo. Colocar la botella en una campana de extracción y encenderla para que se active el ventilador extractor.
- 4.6 Quitar el tapón de la botella para que se evapore la acetona. Colocar el tapón boca arriba dentro de la campana de extracción, de modo que su interior quede expuesto al aire.
 

*Nota: La evaporación de la acetona puede generar algo de presión en la botella. Se trata de un fenómeno habitual, por lo que el tapón ha de desenroscarse con cuidado.*
- 4.7 Sostener la botella en un ángulo de 45° aproximadamente, con el cuello hacia arriba. Hacerla girar sobre sí misma cinco veces como mínimo para recubrir la base (figura 12, paso 5).
- 4.8 Inclinar ligeramente la botella hacia abajo, procurando que no caiga nada del líquido remanente, girarla sobre sí misma cinco veces como mínimo para recubrir la parte superior (figura 12, paso 6). Repetir los pasos 4.7 y 4.8 dos veces como mínimo.
- 4.9 Colocar la botella en horizontal bajo la campana de extracción. Hacerla rodar hacia delante y detrás 10 veces como mínimo, voltearla y hacerla rodar otras 10 veces o más para que todas las paredes queden recubiertas (figura 12, paso 7).
- 4.10 Repetir los pasos 4.7 a 4.9 tres veces como mínimo, hasta que el disolvente se haya evaporado y ya no sea visible. Sosteniendo la botella en un ángulo de 45° aproximadamente, con el cuello hacia arriba, comprobar si se acumula disolvente en la base de la botella.

**Figura 12. Procedimiento para recubrir el interior de las botellas uniformemente con acetona**



*Fuente:* Adaptado de Organización Mundial de la Salud. Standard operating procedure for evaluating the sterilizing properties of pyriproxyfen in adult female mosquitoes in WHO bottle bioassays. SOP version: PPXN-Bioassay/01/14 January 2022. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://www.who.int/publications/i/item/9789240043794>.

- Dejar secar las botellas y los tapones durante dos horas: Envolver las botellas en papel de aluminio para proteger el contenido de la luz. Dejar las botellas abiertas y los tapones bajo una campana extractora (o en una estancia aparte con ventilación), sin perturbaciones, durante dos horas. Una vez transcurrido ese período de secado, comprobar si la superficie interior de las botellas está completamente seca.

*Nota: El intervalo de tiempo entre el recubrimiento de las botellas y el bioensayo no es de 24 horas, como se recomienda en el caso de otros insecticidas, sino de dos horas, que es el período de secado de las botellas y los tapones. La campana extractora de gases debe permanecer encendida mientras se secan las botellas y los tapones, y no debe ser utilizada o limpiada por otros operarios. Se puede limpiar el equipo (por ejemplo, las pipetas) en la campana extractora, pero sin que su limpieza interfiera en el secado de las botellas y los tapones.*

- Almacenamiento de las botellas: Cerrar con los tapones las botellas recubiertas y depositarlas en un lugar fresco, seco y oscuro hasta su utilización.

*Nota: Al principio, se puede practicar el procedimiento para recubrir uniformemente las botellas recubriendo una o más con una mezcla de acetona y algún colorante (por ejemplo, tinta).*

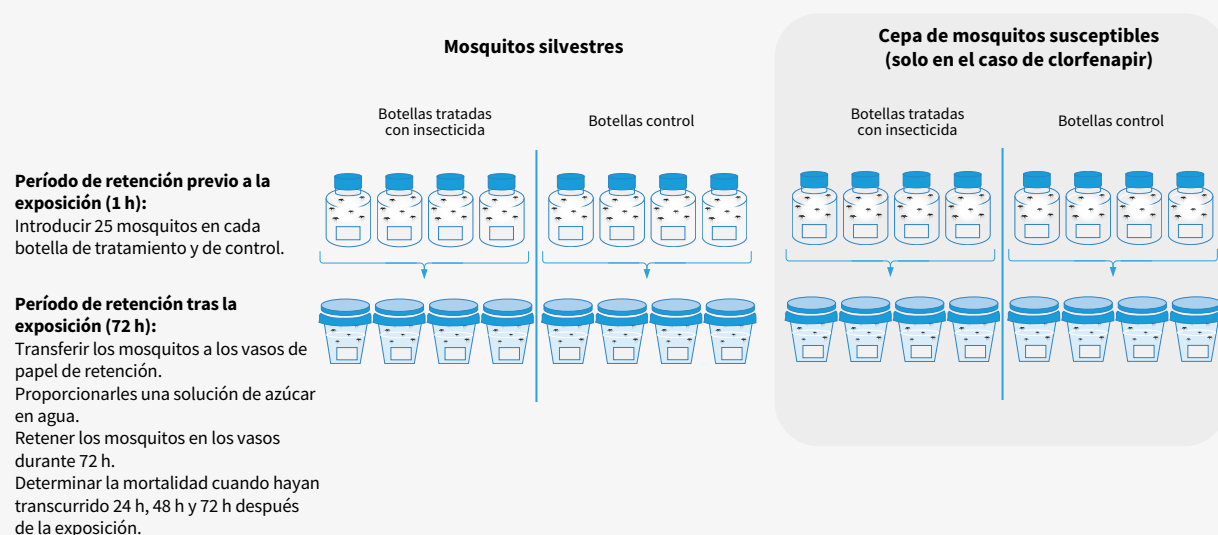
## Segundo paso: Alimentación de los mosquitos con sangre

- Una hora antes de que comience la exposición al piriproxifeno se ha de proporcionar a los mosquitos de la prueba (tanto a los recolectados en el medio silvestre como a los de la colonia susceptible) acceso a sangre para que se alimenten.

## Tercer paso: Exposición de los mosquitos al piriproxifeno en botellas y retención durante 72 horas tras la exposición

En la figura 13 se muestra un diagrama del proceso para la exposición de los mosquitos silvestres y cepas susceptibles.

**Figura 13. Diagrama del proceso de exposición de los mosquitos al piriproxifeno en botellas de vidrio**



*Fuente:* Adaptado de Organización Mundial de la Salud. Standard operating procedure for evaluating the sterilizing properties of pyriproxyfen in adult female mosquitoes in WHO bottle bioassays. SOP version: PPXN-Bioassay/01/14 January 2022. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://www.who.int/publications/i/item/9789240043794>.

8. Preparar las botellas para la introducción de los mosquitos: Alinear las botellas con los tapones enroscados pero sin apretar para que resulte fácil introducir los mosquitos. Colocar un trozo de malla sobre la boca de cada botella y sujetarlo con una banda elástica. Aspirar los mosquitos e introducirlos en las botellas: Introducir los mosquitos en las botellas de control y después en las botellas impregnadas con piriproxifeno. Utilizar aspiradores distintos para las botellas de control y las botellas tratadas.

*Nota: Las hembras de mosquito adultas, de 5 a 7 días de edad, deben haberse alimentado con sangre una hora antes de su introducción en la botella.*

Para introducir los mosquitos en cada botella:

- 8.1 Empleando preferentemente un aspirador mecánico, recolectar los 25 mosquitos alimentados con sangre que se han de introducir en cada botella.
  - 8.2 Insertar el aspirador con los 25 mosquitos en el orificio de la malla que cubre la boca de la botella. Situar la abertura del aspirador en la parte central de la botella y golpear con suavidad el aspirador para que los mosquitos pasen a la botella.
  - 8.3 Cerrar rápidamente la botella con el tapón para evitar que los mosquitos escapen.
  - 8.4 Colocar la botella en posición vertical y poner en marcha el cronómetro para medir el tiempo de exposición.
9. Dejar los mosquitos en exposición en la botella durante una hora.
10. Durante el período de exposición, preparar los vasos de papel para la retención: Colocar un trozo de malla sobre la boca de cada vaso de papel de 440 ml y sujetarlo con una banda elástica.
11. Transferir los mosquitos a los vasos de retención y mantenerlos durante 72 horas a contar desde la hora de exposición: Extraer con cuidado los mosquitos de cada botella mediante succión, preferentemente con un aspirador mecánico, y transferirlos a un vaso de retención cubierto con una malla. Colocar un algodón empapado en una solución azucarada al 10% sobre la malla y mantener los vasos a una temperatura de  $27\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  y una humedad relativa del  $75\% \pm 10\%$  durante 72 horas.
12. Anotar el número de mosquitos caídos: Inmediatamente después de transferir los mosquitos a los vasos, anotar la cantidad de mosquitos caídos (según la definición del cuadro 8).
13. Anotar la mortalidad cada 24 horas: Contar y anotar el número de mosquitos vivos y de mosquitos muertos (según las definiciones del cuadro 8) 24, 48 y 72 horas después de la hora de exposición y tanto en los vasos tratados como en los de control. Anotar los datos en la ficha de registro (anexo 8) o en el sistema electrónico de recogida de datos.

### Cuadro 8. Definiciones de la OMS de caída y mortalidad de los mosquitos tras la prueba

MOSQUITOS CONSIDERADOS VIVOS TRAS 1 H DE EXPOSICIÓN O 24, 48 O 72 H DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN	MOSQUITOS CONSIDERADOS CAÍDOS TRAS 1 H DE EXPOSICIÓN O MUERTOS 24, 48 O 72 H DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN
Puede mantenerse sobre las patas y volar con coordinación.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin señales de vida; inmóvil; no puede mantenerse sobre las patas.</li> <li>• Todo mosquito que no pueda mantenerse sobre las patas (por ejemplo, porque solo tiene una o dos).</li> <li>• Todo mosquito que no pueda volar con coordinación.</li> <li>• Todo mosquito tendido sobre el dorso, que mueva las patas y las alas pero sea incapaz de levantar el vuelo.</li> <li>• Todo mosquito que pueda mantenerse sobre las patas y levantar el vuelo pero caiga de inmediato.</li> </ul>

Fuentes: Organización Mundial de la Salud. Report of the fifteenth WHOPES working group meeting: WHO/HQ, Geneva, 18- 22 June 2012: review of Olyset plus, Interceptor LN, Malathion 440 EW, Vectobac GR. Ginebra: OMS; 2012. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/75304>. Organización Mundial de la Salud. Standard operating procedure for evaluating the sterilizing properties of pyriproxyfen in adult female mosquitoes in WHO bottle bioassays. SOP version: PPXN-Bioassay/01/14 January 2022. Ginebra: OMS; 2022 [citado el 7 de septiembre del 2022]. Disponible en <https://www.who.int/publications/i/item/9789240043794>.

## **Cuarto paso: Introducción de los mosquitos en cámaras para la oviposición**

- 14.** Antes de que finalice el período de retención, preparar las cámaras individuales para la oviposición:
  - 14.1** Tomar un vaso de papel (100 ml) por cada mosquito que quede vivo en los vasos de retención de tratamiento y de control, cortar trozos circulares de malla y preparar una jeringa y agua desionizada.
  - 14.2** Etiquetar cada vaso como “tratamiento” o “control”. Numerarlos y organizarlos según el número de mosquitos vivos alimentados con sangre que haya en los vasos de tratamiento y de control (por ejemplo, control 1, control 2, control 3, control 4, tratamiento 1, tratamiento 2, tratamiento 3, etc.).
  - 14.3** Con una pipeta o una jeringa graduada, añadir 30 ml de agua desionizada a cada vaso de 100 ml a fin de proporcionar un medio acuático para que las hembras pongan huevos.
  - 14.4** Cubrir cada vaso con un trozo de malla con un agujero circular y sujetarlo con una banda elástica.
- 15.** Transferir los mosquitos de control a las cámaras de oviposición (es decir, los vasos de papel de 100 ml): Con un aspirador, transferir cada mosquito vivo alimentado con sangre, uno por uno, de los vasos de control a un vaso de papel con la etiqueta “control” (por ejemplo, control 1, control 2, control 3, etc.), introduciendo el mosquito a través de la abertura practicada en la malla. En cada vaso de papel se debe introducir un solo mosquito. Colocar un pequeño disco de algodón empapado en una solución de glucosa al 10% sobre el orificio de la malla. Todas las mañanas durante los cuatro días siguientes, reemplazar los discos por otros con una solución azucarada recién preparada.
- 16.** Transferir los mosquitos tratados a las cámaras de oviposición (es decir, los vasos de papel): Con un aspirador distinto, transferir del mismo modo los mosquitos, uno por uno, de los vasos de retención de las hembras tratadas a las cámaras etiquetadas como “tratamiento”. Colocar un pequeño disco de algodón empapado en una solución de glucosa al 10% sobre el orificio de la malla. Todas las mañanas durante los cuatro días siguientes, reemplazar los discos por otros con una solución azucarada recién preparada.
- 17.** Dejar que las hembras de mosquito pongan huevos: Mantener las hembras adultas en los vasos de papel a una temperatura de  $27\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  y una humedad relativa del  $75\% \pm 10\%$  durante cuatro días. Cada día, anotar el número total de mosquitos muertos en la ficha de registro de datos (anexo 8) o en el sistema electrónico de recogida de datos.

## **Quinto paso: Anotar la tasa de oviposición**

- 18.** **Al final del período de siete días (es decir, tres días de retención y cuatro días de permanencia en las cámaras), inspeccionar los vasos (las cámaras) de control y de tratamiento en busca de huevos:** Anotar el número de cámaras positivas (con huevos) y cámaras negativas (sin huevos) en la ficha de registro (anexo 8) o en el sistema electrónico de recogida de datos.

# Cálculo, ajuste de mortalidad e interpretación de resultados de las pruebas de evaluación de resistencia de vectores a los insecticidas

Durante el desarrollo de las pruebas, deben anotarse los datos en formularios de registro digitales o impresos dispuestos para cada tipo de prueba. Los formularios digitales basados en el sistema DHIS2 se encuentran disponibles en el sitio web del Programa Mundial sobre Malaria de la OMS (1).

## Cálculos y ajustes de mortalidad e interpretación de resultados de los bioensayos en tubos

El anexo 4 contiene una plantilla de registro de datos en papel. El criterio de valoración de la prueba es la mortalidad de los mosquitos 24 horas después de la hora de exposición al insecticida. La mortalidad de los mosquitos ha de calcularse por separado para los tubos de exposición y para los tubos de control (1,6).

La mortalidad de los mosquitos expuestos y de control se calcula sumando el número de mosquitos muertos en todas las réplicas con papeles impregnados de insecticida y expresando esa cifra como porcentaje del número total de mosquitos en esas réplicas (1,6).

Para obtener los resultados de una prueba, se realizan las siguientes estimaciones:

1. Tasa de mortalidad de los mosquitos expuestos.
2. Tasa de mortalidad de los mosquitos de control.
3. Corrección de la mortalidad:
  - La tasa de la mortalidad de los mosquitos de los tubos de exposición se expresa como porcentaje y se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Mortalidad de expuestos} = \frac{\text{número de mosquitos expuestos muertos}}{\text{número total de mosquitos expuestos}} \times 100$$

- La tasa de la mortalidad de los mosquitos de los tubos de control también debe expresarse como porcentaje y se calcula de la manera siguiente:

$$\text{Mortalidad de controles} = \frac{\text{número de mosquitos de control muertos}}{\text{número total de mosquitos de control}} \times 100$$

- Una vez realizados los cálculos correspondientes y, con atención en la mortalidad registrada en los tubos de control, se deben considerar los siguientes criterios:
  - Si la mortalidad de los controles es <5%, no es necesario corregir los resultados de la prueba.
  - Si la mortalidad de los controles es ≥5% y ≤20%, la mortalidad de la prueba debe corregirse con la mortalidad de los controles mediante la fórmula de Abbott:

$$Mortalidad\ corregida = \frac{(\% \text{ mortalidad de expuestos} - \% \text{ mortalidad de controles})}{(100 - \% \text{ mortalidad de controles})} \times 100$$

## **Criterio de desestimación de prueba en tubos**

La prueba deberá desestimarse y repetirse si la mortalidad de los controles es >20%.

## **Cálculos y ajustes de mortalidad e interpretación de resultados para bioensayos en botellas**

Los datos obtenidos durante la prueba se anotan en el formulario que se presenta en el anexo 5. El criterio de valoración de la prueba es la mortalidad de los mosquitos al cabo de las 24 horas (72 horas en el caso del clorfenapir) siguientes a la exposición al insecticida. Entonces, se debe contar el número de mosquitos muertos 24 horas (72 horas en el caso del clorfenapir) después del período de exposición de una hora.

Debe calcularse por separado la mortalidad de los mosquitos de las botellas de tratamiento y de las botellas de control y, en el caso del clorfenapir, evaluar por separado la mortalidad de los mosquitos silvestres y la de la colonia susceptible, por lo que con el clorfenapir se calcula la mortalidad de cada uno de los cuatro siguientes grupos de mosquitos (1,7):

- a. Silvestres de control.
- b. Silvestres expuestos.
- c. Colonia susceptible de control.
- d. Colonia susceptible expuestos.

La mortalidad de los mosquitos tratados y de los controles se calcula de la manera siguiente:

$$Mortalidad\ de\ tratados\ (\%) = \frac{\text{número de hembras tratadas muertas}}{\text{número total de hembras tratadas}} \times 100$$

$$Mortalidad\ de\ controles\ (\%) = \frac{\text{número de hembras de control muertas}}{\text{número total de hembras de control}} \times 100$$

- Si la mortalidad de los controles es <5%, no es necesario corregir los resultados de la prueba.
- Si la mortalidad de los controles es ≥5% y ≤20%, la mortalidad de la prueba debe corregirse con la mortalidad de los controles mediante la fórmula de Abbott:

$$Mortalidad\ corregida = \frac{(\% \text{ de mortalidad de tratados} - \% \text{ de mortalidad de controles})}{(100 - \% \text{ de mortalidad de controles})} \times 100$$



## **Criterios de desestimación de prueba en botellas**

Con cualquiera de los insecticidas la prueba deberá desestimarse y repetirse si la mortalidad de los controles es >20%. En el caso del clorfenapir, el bioensayo deberá desestimarse si la mortalidad del grupo de control de mosquitos silvestres o de la colonia susceptible es >20%, o si la temperatura durante el bioensayo no se ha mantenido a  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

## **Interpretación de resultados de los bioensayos de susceptibilidad en tubos y en botellas**

### **En el caso de los adulticidas (excepto el clorfenapir)**

Solo son susceptibles de interpretación los ensayos realizados estrictamente conforme a procedimientos operativos estándar para cada tipo de prueba. En caso de que haya sido necesario corregir la mortalidad mediante la fórmula de Abbott, los resultados del ensayo deben interpretarse después de la corrección.

- **Resistencia confirmada:** Si la mortalidad (corregida, si es necesario) es <90%, la población de vectores puede considerarse resistente al insecticida, siempre y cuando se hayan sometido al ensayo 100 mosquitos como mínimo.
- **Posible resistencia:** Si la mortalidad (corregida, si es necesario) es  $\geq 90\%$  pero <98%, es posible que exista resistencia, pero no queda confirmado. Deben confirmarse los resultados repitiendo el ensayo con una nueva muestra de la misma población de mosquitos (nota: procure no utilizar la F1 de los mosquitos sometidos al ensayo). Si en los dos ensayos se observa que la mortalidad es <98%, queda confirmada la resistencia.
- **Susceptibilidad:** Si la mortalidad (corregida, si es necesario) es  $\geq 98\%$ , la población de vectores puede considerarse susceptible al insecticida.

### **Excepción en el caso del clorfenapir**

En el bioensayo en botellas de la OMS con clorfenapir se ha observado cierta variabilidad en los resultados obtenidos en distintos laboratorios debido a la gran influencia de las condiciones de la prueba (en especial, la temperatura).

Para confirmar la resistencia de una población de vectores silvestres al clorfenapir, deben realizarse, como mínimo, tres bioensayos en botellas de la OMS con la misma población y en los cuales deben cumplirse los siguientes tres criterios:

- La mortalidad de los mosquitos del ensayo debe ser <90%, 72 horas después de la exposición.
- La mortalidad de la colonia susceptible de laboratorio debe ser  $\geq 98\%$ , 72 horas después de la exposición (evaluada en paralelo a la de los mosquitos silvestres).
- La temperatura durante el bioensayo debe mantenerse estrictamente en un intervalo de  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

## **Cálculos y ajustes de mortalidad e interpretación de resultados de las pruebas de la OMS en tubos que evalúan la capacidad del butóxido de piperonilo para restablecer la susceptibilidad a los insecticidas piretroides**

El criterio de valoración de la prueba es la comparación de la mortalidad observada 24 horas después de la exposición de los mosquitos expuestos solo al insecticida con la de los mosquitos expuestos al sinergista seguida de la exposición al insecticida (1,8).

Durante la prueba los datos se registran en el formulario que se presenta en el anexo 7. La mortalidad de los mosquitos de control y la observada 24 horas después de la exposición al sinergista constituyen datos necesarios para validar y ajustar los resultados de la prueba. En ese sentido, la mortalidad de los mosquitos 24 horas después de la exposición ha de calcularse por separado en cada uno de los cuatro grupos de exposición (1,8):

- a. Cálculo de mortalidad de expuestos a “BOP + piretroide”.
- b. Cálculo de mortalidad de expuestos a “Solo piretroide”.
- c. Cálculo de mortalidad de expuestos a “Solo BOP”.
- d. Cálculo de mortalidad del control.

La mortalidad se calcula sumando el número de mosquitos muertos en todas las réplicas de cada grupo de exposición y expresando esa cifra como porcentaje del número total de mosquitos expuestos en ese grupo:

$$a. \text{ Mortalidad de "BOP+piretroide" (\%)} = \frac{\text{número de hembras expuestas a BOP+piretroide muertas}}{\text{número total de hembras expuestas a BOP+piretroide}} \times 100$$

$$b. \text{ Mortalidad de "Solo piretroide" (\%)} = \frac{\text{número de hembras expuestas solo a un piretroide muertas}}{\text{número total de hembras expuestas solo a un piretroide}} \times 100$$

$$c. \text{ Mortalidad de "Solo BOP" (\%)} = \frac{\text{número de hembras expuestas solo al BOP muertas}}{\text{número total de hembras expuestas solo al BOP}} \times 100$$

$$d. \text{ Mortalidad de controles (\%)} = \frac{\text{número de mosquitos de control muertos}}{\text{número total de mosquitos de control}} \times 100$$

Si la mortalidad del grupo de control es <5%, no es necesario corregir los resultados de la prueba. Si la mortalidad del grupo de control es ≥5% y ≤20%, la mortalidad de la prueba debe corregirse con la mortalidad de los controles mediante la fórmula de Abbott:

$$\text{Mortalidad corregida} = \frac{(\% \text{ de mortalidad observada} - \% \text{ de mortalidad de controles})}{(100 - \% \text{ de mortalidad de controles})} \times 100$$

### **Criterios de desestimación de prueba para determinar la capacidad del butóxido de piperonilo de restablecer la susceptibilidad de los mosquitos adultos a los insecticidas piretroides mediante pruebas en tubos**

El bioensayo deberá desestimarse:

- a. Si la mortalidad del grupo de “Control” es >20%; o
- b. Si la mortalidad del grupo “Solo BOP” es >10%.

## Interpretación de resultados de los bioensayos de la OMS en tubos para determinar la capacidad del butóxido de piperonilo para restablecer la susceptibilidad a los insecticidas piretroides

Los bioensayos con un insecticida y un sinergista solo deben realizarse en poblaciones de mosquitos que sean resistentes al insecticida cuyo efecto potencie el sinergista. Una vez corregida la mortalidad mediante la fórmula de Abbott (si corresponde), se puede comparar la mortalidad del grupo “BOP + piretroide” con la del grupo “Solo piretroide” a fin de evaluar la capacidad del BOP para restablecer la susceptibilidad de los mosquitos a los piretroides (1,8).

Si la mortalidad de los mosquitos de las réplicas del grupo “Solo insecticida” es  $\geq 90\%$ , el efecto del BOP no se puede evaluar con fiabilidad.

Si la mortalidad de los mosquitos de las réplicas del grupo “Solo insecticida” es  $< 90\%$ , los resultados se clasifican como se indica a continuación:

- **Restablecimiento total de la susceptibilidad:** cuando la mortalidad del grupo “BOP + piretroide” es  $\geq 98\%$ . Ante este resultado, se puede deducir que el mecanismo metabólico de resistencia sobre el que actúa el sinergista es el principal responsable de la resistencia fenotípica observada en la población de mosquitos evaluada.
- **Restablecimiento parcial de la susceptibilidad:** cuando la mortalidad del grupo “BOP + piretroide” es  $< 98\%$  pero, como mínimo, un 10% mayor que la mortalidad media del grupo “Solo piretroide”. En esta situación se entiende que el mecanismo metabólico de resistencia sobre el que actúa el sinergista solo explicaría en parte la resistencia fenotípica observada en la población de mosquitos evaluada y que existirían otros mecanismos de resistencia involucrados.
- **No se restablece la susceptibilidad:**
  - Si la mortalidad del grupo “BOP + piretroide” es igual o menor que la del grupo “Solo piretroide”, o
  - Si la mortalidad del grupo “BOP + piretroide” es mayor que la del grupo “Solo piretroide” pero en menos del 10%.

Con estos resultados se puede deducir que la resistencia fenotípica observada en la población de mosquitos evaluada no se debe al mecanismo metabólico de resistencia sobre el que actúa el sinergista.

## Cálculos de mortalidad y ajustes a los cálculos para evaluar las propiedades esterilizantes del piriproxifeno en hembras de mosquito adultas mediante bioensayos en botellas

El registro de los datos durante el desarrollo de la prueba se realiza en el formulario presentado en el anexo 8. El criterio de valoración de la prueba es la inhibición de la oviposición de los mosquitos silvestres siete días después de haber sido expuestos al regulador del crecimiento de los insectos (tres días de retención inicial más cuatro días de permanencia en cámaras individuales). Para calcular la inhibición de la oviposición, en primer lugar es necesario calcular la tasa de oviposición de las hembras de control y de las hembras tratadas, tanto de la colonia susceptible como de la silvestre (1,9).

- La tasa de oviposición es la proporción de hembras que han puesto huevos tras el período de retención de 72 horas respecto del total de hembras introducidas en las cámaras:

$$\text{Oviposición (\%)} = \frac{\text{número de hembras que han puesto huevos}}{\text{número total de hembras introducidas en las cámaras}} \times 100$$

- La reducción de la tasa de oviposición (inhibición de la oviposición) se calcula dividiendo el porcentaje de reducción de la tasa de oviposición de las hembras tratadas por el porcentaje de reducción de la tasa de oviposición de las hembras de control:

$$\text{Inhibición de la oviposición (\%)} = \left[ 1 - \frac{(\% \text{ de oviposición de las hembras tratadas})}{(\% \text{ de oviposición de las hembras de control})} \right] \times 100$$

**La mortalidad de los controles 72 horas** después de la exposición, necesaria para validar la prueba, se calcula sumando el número de hembras de control muertas en todas las réplicas y expresando esa cifra como porcentaje del número total de hembras de control mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Mortalidad de los controles (\%)} = \frac{\text{número de hembras de control muertas}}{\text{número total de hembras de control}} \times 100$$

## **Criterios de desestimación de las pruebas de la OMS en botellas que evalúan las propiedades esterilizantes del piriproxifeno en hembras de mosquito**

La prueba debe desestimarse si se cumple alguna de las condiciones siguientes (1,9):

- Al cabo de 72 horas tras la exposición, la mortalidad de los mosquitos de control de la cepa susceptible de laboratorio o de la muestra recolectada en el medio silvestre es >20%.
- Al final del día 7 tras la hora de exposición al piriproxifeno, la tasa de oviposición de los mosquitos de control de la cepa susceptible de laboratorio o de la muestra recolectada en el medio silvestre es ≤30%.
- Al final del día 7 tras la hora de exposición al piriproxifeno, la inhibición de la oviposición de la cepa susceptible de laboratorio es <98%.

## **Interpretación de resultados de los bioensayos en botellas para evaluar las propiedades esterilizantes del piriproxifeno en hembras de mosquito adultas**

### **En el caso de los análogos de hormonas juveniles (por ejemplo, el piriproxifeno)**

A efectos de la interpretación de los resultados, solo deben tenerse en cuenta los ensayos en los que se haya evaluado una cepa susceptible de laboratorio en paralelo a la muestra de mosquitos silvestres.

- **Resistencia confirmada:** Si, al finalizar el período de retención en un vaso de papel (es decir, el día 7 después de 1 h de exposición a la concentración discriminante del análogo de hormonas juveniles), la inhibición de la oviposición es <90% en la muestra de mosquitos silvestres y ≥98% en la cepa de mosquitos susceptibles (evaluada en paralelo), la población de mosquitos puede considerarse resistente al insecticida.
- **Posible resistencia:** Si, al finalizar el período de retención en un vaso de papel (es decir, el día 7 después de 1 h de exposición a la concentración discriminante del análogo de hormonas juveniles), la inhibición de la oviposición es ≥90% pero <98% en la muestra de mosquitos silvestres y ≥98% en la cepa de mosquitos susceptibles (evaluada en paralelo), es posible que exista resistencia, pero no queda confirmado. Deben confirmarse los resultados repitiendo el ensayo con una nueva muestra de la misma población de mosquitos (nota: procúrese no utilizar la F1 de los mosquitos sometidos al ensayo). Si en los dos ensayos se observa que la inhibición de la oviposición es <98% en los mosquitos silvestres y ≥98% en la cepa de mosquitos susceptibles (evaluada en paralelo), queda confirmada la resistencia.
- **Susceptibilidad:** Si, al finalizar el período de retención en un vaso de papel (es decir, el día 7 después de 1 h de exposición a la concentración discriminante del análogo de hormonas juveniles), la inhibición de la oviposición es ≥98% en la muestra de mosquitos silvestres y ≥98% en la cepa de

mosquitos susceptibles (evaluada en paralelo), la población de mosquitos puede considerarse susceptible al insecticida.

*Nota: los procedimientos para evaluar la resistencia de los vectores al piriproxifeno son nuevos y se han elaborado a partir de cepas de mosquitos de laboratorio, por lo que aún deben validarse más ampliamente, con poblaciones de mosquitos silvestres de distintos entornos. Cabe la posibilidad de que los resultados obtenidos con mosquitos silvestres den lugar a la modificación del procedimiento de ensayo o de la interpretación de sus resultados.*

## Interpretación de los bioensayos de intensidad (5× y 10× de las concentraciones discriminantes)

Los resultados de los bioensayos de intensidad solo pueden interpretarse si previamente se ha confirmado la resistencia al insecticida mediante bioensayos de susceptibilidad con la correspondiente concentración discriminante. Posteriormente se puede evaluar la intensidad de la resistencia a ese insecticida mediante una comparación de la mortalidad de los mosquitos expuestos a papeles o botellas tratados con una, cinco y diez veces la concentración discriminante. Cuando sea necesario corregir la mortalidad con la fórmula de Abbott, los resultados del ensayo deben interpretarse solo después de la corrección. A continuación, se indican las recomendaciones actuales de interpretación de los resultados (1).

- **Resistencia de baja intensidad:** Si la mortalidad de los mosquitos (corregida, si es necesario) es <90% después de la exposición a la concentración discriminante (1×) y  $\geq 98\%$  después de la exposición a 5× la concentración discriminante, la resistencia se considera de baja intensidad. En ese caso, no es necesario realizar un bioensayo con 10× la concentración discriminante.
- **Resistencia de intensidad moderada:** Si la mortalidad de los mosquitos (corregida, si es necesario) es <90% después de la exposición a la concentración discriminante (1×) y <98% después de la exposición a 5× la concentración discriminante, la resistencia se considera de intensidad moderada. Se ha de realizar un nuevo bioensayo con 10× la concentración discriminante para determinar si la intensidad es moderada o alta. Si la mortalidad después de la exposición a 10× la concentración discriminante es  $\geq 98\%$ , queda confirmado que la resistencia es de intensidad moderada.
- **Resistencia de alta intensidad:** Si la mortalidad de los mosquitos (corregida, si es necesario) es <90% después de la exposición a la concentración discriminante (1×) y <98% después de la exposición tanto a 5× como a 10× la concentración discriminante, la resistencia se considera de alta intensidad.

# Pruebas de susceptibilidad de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades para mosquitos adultos

La prueba de susceptibilidad diseñada por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC, por su sigla en inglés) es un método complementario para la evaluación y la detección de la resistencia de los vectores a los insecticidas (con excepción de los análogos de hormonas juveniles). La prueba de la botella de los CDC se basa en el tiempo de mortalidad de los insectos, que corresponde al tiempo que transcurre entre el contacto de los mosquitos con el insecticida hasta que se registra la mortalidad de aquellos después de recorrer los tejidos intermedios y actuar sobre el sitio diana. El retraso del efecto del insecticida en los mosquitos indicaría que existen factores que contribuyen a la aparición de resistencia al insecticida evaluado. Asimismo, la información obtenida por las pruebas, combinada con resultados de ensayos biológicos efectuados con sinergistas, además de pruebas bioquímicas y moleculares, permite establecer los mecanismos responsables de la presencia de resistencia (10).

A diferencia de la prueba de la OMS, que registra la tasa de mortalidad de mosquitos expuestos a una dosis discriminante de insecticidas durante un tiempo determinado, la prueba de la botella de los CDC mide el tiempo discriminante que se requiere para incapacitar a mosquitos susceptibles con una concentración predeterminada de insecticidas. La dosis diagnóstica es la dosis de insecticida que elimina 100% de los mosquitos susceptibles en un tiempo determinado. El tiempo de diagnóstico es el tiempo previsto para que el insecticida cumpla este objetivo (100% de mortalidad). En el cuadro 9 se presentan las diferencias de interpretación de los resultados de susceptibilidad de los bioensayos en botellas con respecto al método de botellas de los CDC (1).

50

**Cuadro 9. Diferencias de interpretación de los resultados de susceptibilidad entre los bioensayos en botellas de la Organización Mundial de la Salud y los de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades**

PROCEDIMIENTO	SE CONSIDERA QUE UNA POBLACIÓN DE VECTORES ES RESISTENTE A UN INSECTICIDA CUANDO:
Bioensayos normalizados de la OMS (prueba en tubos y bioensayo en botellas)	La mortalidad de los mosquitos medida al finalizar el período de retención (generalmente 24 h) tras la exposición a una concentración discriminante del insecticida sea inferior al 98% (posible resistencia) o al 90% (resistencia confirmada).
Bioensayo de los CDC en botellas	La mortalidad de los mosquitos medida inmediatamente después de la exposición a una dosis diagnóstica de insecticida durante un período de diagnóstico de 30 o 45 min (según el tipo de insecticida) sea inferior al 98% (posible resistencia) o al 90% (resistencia confirmada).

Nota:

CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. OMS: Organización Mundial de la Salud.

Fuente: Organización Mundial de la Salud. Manual for monitoring insecticide resistance in mosquito vectors and selecting appropriate interventions [Internet]. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/356964>.

Por otro lado, al igual que la prueba de la OMS, la prueba de la botella de los CDC puede realizarse en *Anopheles* o *Aedes* hembras adultas recolectadas en el campo o en poblaciones criadas en insectarios a partir de larvas recolectadas en el campo (10). En el cuadro 10 se muestran las ventajas y desventajas de la implementación del bioensayo en botellas de los CDC con respecto al método de botellas de OMS (1).

### Cuadro 10. Ventajas y desventajas del bioensayo en botellas de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades frente a la prueba en tubos de la Organización Mundial de la Salud para insecticidas

VENTAJAS	DESVENTAJAS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• El procedimiento es más rápido (por ejemplo, no se requiere un período de retención de 24 h o más).</li> <li>• Los materiales son más accesibles: las botellas Wheaton® de 250 ml son fáciles de conseguir y se necesitan cantidades muy pequeñas de insecticida de calidad técnica.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Las botellas no se preparan mediante procedimientos normalizados en un centro de producción centralizada y calidad garantizada, sino que ha de recubrirlas un técnico en cada lugar de vigilancia. Este requisito puede influir en la calidad del recubrimiento de las botellas y, por lo tanto, en la comparabilidad de los resultados.</li> <li>• Se requiere personal capacitado para manipular los insecticidas a fin de evitar la exposición perjudicial a insecticidas concentrados durante el recubrimiento de las botellas.</li> <li>• La adquisición y el transporte de las botellas de vidrio y las alcuotas de insecticidas a lugares sobre el terreno o a laboratorios de ensayo descentralizados suelen resultar más complicados que transportar tubos de plástico y papeles impregnados.</li> </ul>

*Nota:*  
 CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades.

*Fuente:* Organización Mundial de la Salud. Manual for monitoring insecticide resistance in mosquito vectors and selecting appropriate interventions [Internet]. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/356964>.

La prueba de la botella de los CDC puede utilizarse para la evaluación con tiempos de exposición y dosis discriminantes y para la evaluación de concentraciones crecientes (2x, 5x, 10x de la dosis discriminante) para determinar la intensidad de la resistencia a los insecticidas. Las dosis y tiempos diagnósticos están definidos y estandarizados para su uso en *Anopheles* y en *Aedes*. La utilización de los parámetros establecidos servirá para identificar cambios de la susceptibilidad de los vectores a los insecticidas evaluados. Por su parte, el bioensayo de evaluación de intensidad de la resistencia permite establecer el grado de resistencia que los mosquitos podrían tener a los insecticidas evaluados (10).

Los detalles sobre la realización de las pruebas de susceptibilidad de los CDC para mosquitos adultos se encuentran descritos en el documento Instrucciones para la Evaluación de la Resistencia a Insecticidas en Vectores mediante el Ensayo Biológico de la Botella de los CDC, donde se pueden consultar todos los materiales didácticos e instrucciones detalladas (10). A continuación, se presenta un resumen de las características de los fundamentos, materiales y procedimientos necesarios para llevar a cabo los bioensayos.

## Materiales para la realización de pruebas de susceptibilidad

A continuación, se detallan los materiales necesarios para las pruebas de susceptibilidad de los CDC (10).

### Material biológico

Para efectuar una prueba de evaluación de la susceptibilidad a un insecticida en condiciones óptimas, se requieren entre 100 y 125 mosquitos hembra adultos. De esta forma, se necesitarán de 20 a 25 mosquitos para cada una de las cinco botellas que se utilizan en la prueba.

Los mosquitos pueden provenir de recolecciones en campo o de poblaciones criadas en insectarios a partir de larvas capturadas en campo. Se recomienda usar mosquitos silvestres (que emergen de huevos o larvas capturados en campo) o, como máximo, la segunda generación de mosquitos recolectados en campo.

Los factores que se deben considerar con respecto a los mosquitos utilizados durante las pruebas son iguales a los que se consideran para los bioensayos de la OMS.

En el cuadro 11 se muestran los reactivos, los insumos y el equipo de protección individual necesarios para realizar la prueba de la botella de los CDC.

**Cuadro 11. Reactivos, insumos de laboratorio y equipo de protección individual necesarios para realizar la prueba de la botella de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades**

Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insecticida a evaluar en grado técnico.</li> <li>• Acetona o etanol absoluto de grado analítico.</li> </ul>
Insumos de laboratorio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 botellas Wheaton® de 250 ml, con tapa rosca (4 botellas para exposición y una botella para control).</li> <li>• Acetona o etanol a 96% o a mayor concentración.</li> <li>• Dosis diagnóstica de los insecticidas a ser evaluados.</li> <li>• Pipetas plásticas graduadas desechables de 1 ml, o micropipetas y puntas.</li> <li>• Capturador de mosquitos con aspirador.</li> <li>• Envases para la transferencia de mosquitos.</li> <li>• Botellas para soluciones madre (concentradas) de los insecticidas, de 100 ml a 1000 ml según las necesidades del volumen de solución madre a ser evaluada. Las botellas pueden ser de color ámbar o estar forradas con papel de aluminio en caso de ser transparentes.</li> <li>• Termohigrómetro digital (con valores mínimo y máximo).</li> <li>• Cronómetro con segundero.</li> <li>• Tijeras.</li> <li>• Cinta adhesiva blanca.</li> <li>• Marcadores indelebles para rotular botellas, tapas y pipetas.</li> <li>• Servilletas.</li> <li>• Papel madera.</li> <li>• Papel de tipo Parafilm®.</li> <li>• Formularios estandarizados para el registro de datos.</li> <li>• Jabón neutro.</li> <li>• Recipientes plásticos para lavado.</li> <li>• Viales de 0,5 µl.</li> <li>• Pinzas de acero inoxidable de punta fina.</li> <li>• Gel de sílice con indicador de humedad.</li> <li>• Bolsas herméticas.</li> </ul>
Equipo de protección individual	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata.</li> <li>• Guantes.</li> <li>• Gafas de protección.</li> </ul>





## Procedimientos para la realización de las pruebas de susceptibilidad

Las pruebas deben realizarse en un lugar sin exposición directa al sol y que no haya sido expuesto a insecticidas antes. Se debe contar con buena iluminación, evitar los sistemas de ventilación y disponer de una mesa lo suficientemente amplia como para colocar las botellas y los demás insumos. También es necesario contar con un área de lavado de materiales. De acuerdo con las indicaciones del CDC, se exponen a continuación los procedimientos necesarios para la realización de los bioensayos (10).

En el cuadro 12 se muestran las dosis diagnósticas y los tiempos de diagnóstico definidos por los CDC para la evaluación de mosquitos *Anopheles* y *Aedes*. Es importante recalcar que la manipulación de insecticidas requiere la utilización de equipo de protección personal y el seguimiento de las normas de bioseguridad respectivas (10).

**Cuadro 12. Dosis diagnósticas de insecticidas y tiempos de diagnóstico para determinar la susceptibilidad a insecticidas de mosquitos *Anopheles* y *Aedes* adultos con las pruebas de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades**

GRUPO QUÍMICO	INSECTICIDAS	ANOPHELES SPP.	AEDES AEGYPTI	TIEMPO DE DIAGNÓSTICO (MIN)
		Dosis diagnóstica (µg/botella)	Dosis diagnóstica (µg/botella)	
Piretroides	Lambdacialotrina	12,5	10	30
	Deltametrina	12,5	10	30
	Permetrina	21,5	15	30
	Cipermetrina	12,5	10	30
	Ciflutrina	12,5	10	30
Organoclorado	DDT	100	75	45
Organofosforados	Malatión	50	50	30
	Fenitrotión	50	50	30
	Pirimifos-metil	20	-	30
Carbamatos	Bendiocarb	12,5	10	30

Nota:

DDT: dicloro difenil tricloroetano.

Fuente: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Instrucciones para la evaluación de la resistencia a insecticida en vectores mediante del ensayo biológico de la botella de los CDC. Atlanta: CDC; 2012.

### Preparación de soluciones madre

Deben seguirse los pasos descritos a continuación (10):

1. El interior de las botellas usadas en el ensayo biológico debe ser recubierto con la dosis diagnóstica del insecticida a evaluar. La dosis diagnóstica es una cantidad determinada de insecticida por botella.
2. Es aconsejable preparar soluciones madre con las concentraciones de insecticida que se usarán para recubrir las botellas.
3. Preparar las soluciones madre de insecticidas diluyendo la cantidad apropiada de insecticida en acetona o etanol de grado técnico (puro). En el cuadro 13 se muestran las cantidades de insecticida de calidad técnica requeridas para preparar soluciones madre de diferentes volúmenes.
4. Etiquetar la botella de solución madre con el nombre del insecticida, la concentración y la fecha de preparación.

5. La solución madre puede almacenarse en el refrigerador a 4 °C en botellas opacas (botellas de color ámbar o, si son transparentes, envueltas en papel de aluminio) hasta el momento de ser usadas (los CDC utilizaron soluciones madre refrigeradas durante dos a tres años sin que se haya observado degradación de la actividad).
6. Sacar la solución madre del refrigerador por lo menos una hora antes de efectuar el bioensayo y agitarla antes de utilizarla para su homogeneización.

**Cuadro 13. Cantidades de insecticida de calidad técnica requeridas para la preparación de soluciones madre de volúmenes diferentes para pruebas de susceptibilidad con metodología de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades**

INSECTICIDA	PESO (MG) DE INSECTICIDA DE GRADO TÉCNICO REQUERIDO POR VOLUMEN DE SOLUCIÓN MADRE PARA ANOPHELES			PESO (MG) DE INSECTICIDA DE GRADO TÉCNICO REQUERIDO POR VOLUMEN DE SOLUCIÓN MADRE PARA AEADES		
	100 ML	500 ML	1000 ML	100 ML	500ML	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
Fenitrotión	5	25	50	5	25	50
Lambdacialotrina	1,25	6,25	12,5	1	5	10
Malatión	5	25	50	5	25	50
Permetrina	2,15	10,75	21,5	1,5	7,5	15
Pirimifos-metil	2	10	20	—	—	—

Nota:  
DDT: dicloro difenil tricloroetano.

Fuente: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Instrucciones para la evaluación de la resistencia a insecticida en vectores mediante del ensayo biológico de la botella de los CDC. Atlanta: CDC; 2012.

**1. Preparación de soluciones madre a partir de insecticida de calidad técnica**

Con base en que se parte, por ejemplo, de deltametrina a 100% de grado técnico (puro), y con el objetivo de obtener una concentración de 12,5 µg/botella, disolver 12,5 mg de insecticida en suficiente acetona o etanol absoluto para obtener 1 l de solución total. De esta manera, 1 ml de esta solución contendrá 12,5 µg del insecticida. Se puede preparar un volumen menor (por ejemplo, 100 ml), pero sin modificar la proporción de insecticida y solvente. Para calcular la cantidad de insecticida que se debe disolver se puede usar una regla de tres simple (6), por ejemplo:

Si se tiene en cuenta el mismo ejemplo y se necesita disolver 12,5 mg del insecticida en 1 l (1000 ml) de solvente (etanol o acetona), la cantidad de insecticida que se requiere para obtener un volumen final de 100 ml se calcula de la siguiente manera:

$$\begin{array}{l}
 12,5 \text{ mg} \longrightarrow 1000 \text{ ml} \\
 X \qquad \qquad \longrightarrow 100 \text{ ml} \\
 \\
 X = \frac{12,5 \text{ mg} \times 100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \\
 X = 1,25
 \end{array}$$

Entonces, se debe disolver 1,25 mg del insecticida en suficiente acetona o etanol absoluto para obtener 100 ml de solución total.

## **2. Preparación de botellas con insecticida**

En este paso se debe utilizar el equipo de protección personal (8):

- a.** Asegurarse de que las botellas estén limpias y libres de polvo y otros residuos (seguir las instrucciones para el lavado).
- b.** Asegurarse de que las botellas estén completamente secas en el momento de la impregnación.
- c.** Sacar la solución madre de insecticida a evaluar del refrigerador para que esté a temperatura ambiente y mezclarla por inversión, con cuidado, para que el insecticida esté bien distribuido.
- d.** Preparar el número requerido de botellas que se necesite impregnar (tener en cuenta que, por cada prueba, se deben impregnar cuatro botellas con el insecticida y una como control con solo el solvente, es decir, etanol o acetona). Si cualquiera de las botellas está sucia o muestra condensación, debe sustituirse por otra.
- e.** Registrar en la botella y en la tapa: el nombre, la concentración ( $\mu\text{g}/\text{botella}$ ) del insecticida, la fecha de impregnación de la botella y el número de esta.
- f.** Tomar una pipeta de plástico limpia y marcarla con el nombre del insecticida y la concentración de la dosis diagnóstica que se utilizará.
- g.** Con esta pipeta de plástico (o con micropipeta con punta limpia), tomar 1 ml de la solución madre y añadirla en la botella. Tapar de inmediato y continuar añadiendo solución de dosis diagnóstica en cada una de las otras botellas.

## **3. Preparar la botella control del bioensayo**

- a.** Colocar 1 ml de etanol o acetona grado analítico (según el solvente del insecticida) en la botella con la pipeta que está marcada como control. Tener cuidado de no contaminar el etanol puro (absoluto) o la acetona que se usa en los controles.
- b.** Luego de tener el insecticida en las botellas, se debe empezar el proceso de su impregnación. Primero, se deben hacer movimientos circulares con la botella para impregnar la base de estas, luego poner la botella boca abajo para impregnar la superficie interna de la tapa y las áreas colindantes (esto incluye el cuello de la botella), y, en tercer lugar, voltear la botella en sentido horizontal y distribuir con suavidad la solución por las paredes. Por último, hacer rodar la botella sobre una superficie horizontal hacia uno y otro lado.
- c.** Luego de varios minutos de haber realizado el paso anterior, retirar la tapa de la botella y continuar rotándola hasta que todo el solvente se haya evaporado por completo.
- d.** Interrumpir el proceso para ver si se forma un cúmulo de solución en el fondo de la botella. Si se ve líquido, continuar rotando la botella destapada tanto tiempo como sea necesario. Este proceso puede llegar a tomar 15 o más minutos, según las condiciones de temperatura y de humedad del sitio de trabajo.
- e.** Dejar las botellas abiertas, sin las tapas, durante una noche y ubicarlas sobre una superficie limpia para asegurarse de que se han secado bien. Cubrir las con papel madera o con una tela para protegerlas de la luz. Las botellas control se deben almacenar en iguales condiciones, pero separadas de las botellas tratadas para evitar que sus gases las contaminen. Lo mismo debe suceder cuando se impregnan botellas con varios insecticidas de manera simultánea: si se guardan destapadas no deben mezclarse ya que se pueden contaminar unas a otras.
- f.** Al día siguiente, luego de constatar que las botellas estén secas, ponerles sus tapas y mantenerlas en un lugar oscuro, seco y fresco (como una caja o armario) hasta su uso.
- g.** Si se ha usado más de un insecticida o más de una dosis al impregnar las botellas, asegurarse de que la tapa corresponda a la misma concentración y al mismo tipo de insecticida que figura en la botella.

## 4. Desarrollo del bioensayo

- a. Cada repetición debe consistir en cinco botellas (cuatro tratadas y una de control).
- b. Poner en línea las botellas, con las tapas sin enroscar para facilitar, la introducción de los mosquitos. Empezar con la botella control y seguir con las botellas tratadas: de esta manera, se puede evitar la contaminación de la botella control.
- c. Aspirar con cuidado un grupo de 25 mosquitos hembra.
- d. Introducir los mosquitos en la botella soplando con cuidado, con la punta del aspirador en la parte central de la botella. Evitar dañar los mosquitos. Prevenir el escape de los mosquitos cubriendo la boca de la botella y tapando con rapidez.
- e. El *tiempo cero* se define como el momento en el que se introducen los mosquitos en cada botella.
- f. Verificar rápidamente si algunos de los mosquitos murieron en el proceso de transferencia a la botella. Anotar este número en el *tiempo cero* del formulario de reporte. Se debe restar este número del número total de mosquitos al final de la prueba.
- g. Observar la mortalidad cada 15 minutos, tanto en las botellas tratadas como en las de control. Para esto, levantar cada botella y girarla con suavidad. Los mosquitos afectados por el insecticida son incapaces de volar y ruedan al rotar la botella. Registrar el número de mosquitos afectados en el formulario de recopilación de datos sugerido (véase el anexo 9).
- h. El ensayo finaliza 120 minutos después de iniciada la exposición.
- i. Una vez finalizado el ensayo, retirar los mosquitos de cada botella, teniendo cuidado de mantener separados los mosquitos muertos de los que sobrevivieron, con el fin de determinar la especie, o especies, en el caso de mosquitos *Anopheles* recolectados en campo.
- j. Cuando las densidades en campo son bajas, es posible que no se tengan suficientes mosquitos para las cuatro botellas tratadas y la de control. En estos casos, lo importante es garantizar una botella control y el resto de los mosquitos en una, dos o tres botellas tratadas. En la figura 14 se muestran los pasos del procedimiento.

## 5. Lavado de las botellas

Enjuagar dos veces las botellas con etanol (no es esencial: una limpieza rigurosa, con jabón y agua, es suficiente), agitar las botellas cada vez y renovar el etanol en cada enjuague.

No desechar el etanol con residuos de insecticida por la tubería: recogerlo en una botella etiquetada específicamente con el nombre de los desechos y descartarlo según las normas de desecho de materiales tóxicos.

- a. Lavar las botellas con agua tibia y jabón.
- b. Dejar las botellas en remojo con agua jabonosa durante una noche.
- c. Enjuagar al menos diez veces las botellas con agua corriente.
- d. Dejar las botellas remojando en agua limpia alrededor de una hora.
- e. Luego de ese lapso, esperar hasta que las botellas se sequen completamente en un lugar limpio y seco. Si se dispone de un horno para cristal, dejar secar cuatro horas a temperatura baja.

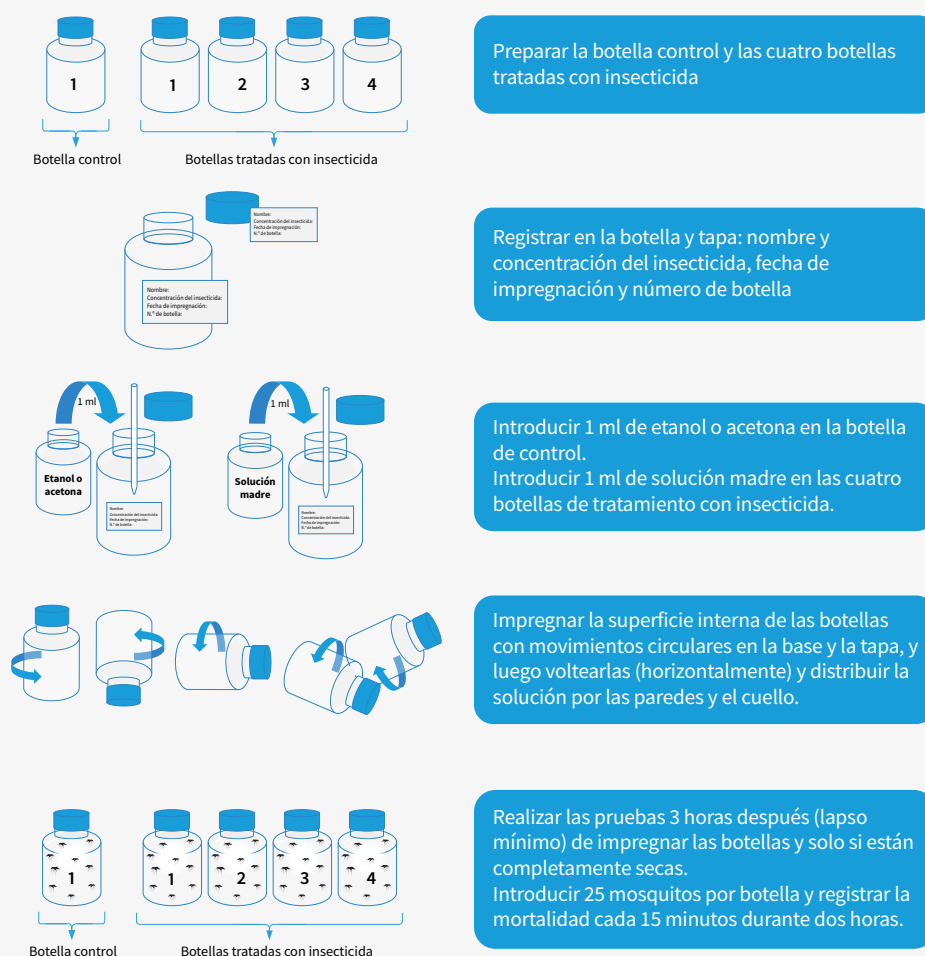
Se debe confirmar que las botellas han sido bien lavadas. Para esto, se seleccionan cinco botellas en forma aleatoria y se introducen algunos mosquitos de cepa de laboratorio susceptible: estos deben continuar vivos tres horas más tarde. Si los mosquitos caen o mueren, comenzar el proceso de lavado de nuevo con todas las botellas.

## Resultados de las pruebas

Para asegurar resultados de calidad con el uso de las botellas, se deben considerar los siguientes aspectos (8):

1. Si transcurre un tiempo prolongado desde la impregnación del insecticida, se deteriora la estabilidad del insecticida.
2. Usar botellas impregnadas con organofosforados hasta dos días después de la impregnación (como máximo).
3. Usar botellas impregnadas con piretroides hasta cinco días después de la impregnación.
4. En caso de contar con un número grande de mosquitos, se recomienda realizar más bioensayos y usar las botellas durante el mismo día.
5. Entre cada prueba se deben dejar las botellas sin tapar por lo menos media hora, para garantizar que estén completamente secas.
6. Cada botella puede usarse como máximo cinco veces, siempre y cuando se mantenga limpia.
7. El exceso de etanol o acetona, además de cierto grado de humedad en las botellas, puede provocar la adhesión de los mosquitos a sus paredes. Esto puede causar sesgos en la interpretación de los resultados o la anulación de los experimentos.

**Figura 14. Pasos para realizar los bioensayos de susceptibilidad con botellas propuestos por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades**



Fuente: Adaptado de Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Instrucciones para la evaluación de la resistencia a insecticida en vectores mediante del ensayo biológico de la botella de los CDC. Atlanta: CDC; 2012.

## Criterios de mortalidad de las pruebas de la botella

Se considera que los mosquitos están muertos (8) cuando estos:

1. Caen al fondo de la botella.
2. Tienen un aspecto anormal (alas abiertas, patas retorcidas).
3. No pueden volar.

Observar el comportamiento de los mosquitos en la botella control puede ayudar a recordar cómo es un mosquito sano.

Mientras se calcula la mortalidad, rotar con cuidado la botella (NO agitarla ni golpearla). Esta rotación estimulará el vuelo en los mosquitos sanos, mientras que a los mosquitos muertos o intoxicados se los verá resbalar a lo largo de la curvatura de la botella, lo que facilita diferenciar unos de otros. Es más fácil contar el número de mosquitos muertos en las primeras lecturas del experimento, y es más fácil contar el número de mosquitos vivos cuando el experimento está por finalizar (10).

## Interpretación de los resultados provenientes de las pruebas de la botella

Al adquirir práctica, la mortalidad de mosquitos en la botella control luego de dos horas (al final del ensayo biológico) debe ser igual a cero. En la mayoría de los casos, se puede ignorar la mortalidad de hasta un 3% en la botella control. Cuando la mortalidad en la botella control luego de las dos horas del ensayo sea de 3% a 10%, es posible usar la fórmula de Abbott para corregir las conclusiones. Si la mortalidad en la botella control es mayor que 10% al final del ensayo biológico, los resultados de esta prueba deben ser desechados y se debe repetir el ensayo. Si un grupo de mosquitos en particular es irremplazable y no es posible repetir el ensayo biológico, se puede considerar la fórmula de Abbott aun cuando la mortalidad del control sea >10% (10):

$$\text{Mortalidad corregida} = \frac{(\% \text{ mortalidad de expuestos} - \% \text{ mortalidad de controles})}{(100\% - \% \text{ mortalidad en control})} \times 100$$

Por ejemplo: si la mortalidad en las botellas expuestas es de 50% en el tiempo de diagnóstico y, en la de control, de 10% en dos horas, la mortalidad corregida es  $([50\% - 10\%] / [100\% - 10\%]) \times 100 = 44,4\%$ .<sup>2</sup>

Las recomendaciones para la interpretación de los resultados del ensayo biológico son las mismas que para el ensayo de la OMS.

////////////////////////////////////

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

En resumen:

1. Una mortalidad de 98%-100% en el tiempo de diagnóstico recomendado indica susceptibilidad en la población.
2. Una mortalidad de 90%-97% en el tiempo de diagnóstico recomendado sugiere la posibilidad de resistencia, que debe ser confirmada.
3. Una mortalidad menor que 90% en el tiempo de diagnóstico recomendado sugiere resistencia.

No se recomienda mantener los mosquitos en observación una vez finalizada la prueba (por ejemplo, 24 horas) para ver si hay o no una recuperación posterior. Dado que la prueba de botella de los CDC mide el tiempo en el que el insecticida llega al sitio diana y afecta a los mosquitos, su recuperación posterior no aporta información adicional (10).

# Mecanismos de resistencia a los insecticidas y métodos de detección

**S**i bien el objetivo principal de esta publicación es presentar los procedimientos para evaluar la susceptibilidad de los vectores a los insecticidas, en virtud de la importancia que tiene la detección de los mecanismos de resistencia para tal propósito, a continuación se destacan algunos de los aspectos más relevantes al respecto. Para más información, véase el manual de la OMS para la vigilancia de la resistencia de los mosquitos vectores a los insecticidas y la selección de intervenciones adecuadas (1).

La resistencia fenotípica es producto de alteraciones genéticas que producen modificaciones funcionales en los mosquitos que les brindan la capacidad de sobrevivir a la exposición a insecticidas. Dichas modificaciones se transmiten a través de las nuevas generaciones de mosquitos, propiciando la propagación de la resistencia de los vectores a los insecticidas. Un aspecto importante sobre la identificación de los mecanismos de resistencia es que estos pueden conferir resistencia a más de un insecticida, puesto que varios de ellos presentan modos de acción similares (cuadro 14). Este fenómeno se denomina “resistencia cruzada” (1).

Son dos los mecanismos de resistencia que mejor se conocen:

- 1.** Resistencia metabólica: Esta surge como consecuencia de cambios en los sistemas enzimáticos del mosquito que hacen posible que se detoxifique de los insecticidas con mayor rapidez. La detoxificación impide que el insecticida alcance el sitio de acción en el organismo del mosquito, o lo protege contra productos metabólicos secundarios. En el caso de los vectores de la malaria, se cree que los insecticidas se metabolizan fundamentalmente a través de tres sistemas enzimáticos:
  - a.** Las esterasas.
  - b.** El citocromo P450.
  - c.** Las glutatión-S-transferasas.
- 2.** Resistencia por alteraciones del sitio diana: La mutación por la que se altera el receptor proteínico constituye el sitio diana de la acción del insecticida. Debido a esto, el pesticida pierde la capacidad de unirse eficazmente al sitio diana molecular. Este tipo de mecanismo se expresa de acuerdo con el tipo de insecticida, como se cita a continuación:
  - a.** Dicloro difenil tricloroetano (DDT) y piretroides: Las mutaciones tienen lugar en los receptores de los canales de sodio por medio de los genes *kdr* y confieren “resistencia al derribo”.
  - b.** Organofosforados y los carbamatos: Las mutaciones afectan a la proteína acetilcolinesterasa y confieren resistencia por medio del gen *ace-1*.
  - c.** Dieldrina y fipronil: La mutación tiene lugar en los receptores del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (gen *rdl*).

Entre los demás mecanismos de resistencia estudiados se pueden mencionar:

- Resistencia cuticular: Consiste en el engrosamiento de la cutícula o en una alteración de esta que provoca reducción de la absorción de un insecticida. Estas modificaciones se atribuyen a la sobreexpresión de uno o más de los diversos genes implicados en la formación de la cutícula.
- Resistencia por comportamiento: Se debe a la modificación del comportamiento de los mosquitos mediante la cual evitan o reducen el contacto con los insecticidas. El fundamento genético de este tipo de resistencia no es bien conocido.



Un elemento importante para considerar con respecto a la identificación de los mecanismos de resistencia es que las pruebas necesarias para su determinación requieren de capacidades de laboratorio y materiales específicos que pueden resultar costosos, por lo que en los programas nacionales de lucha contra las enfermedades transmitidas por vectores se debe trabajar en la creación de vínculos de cooperación con las instituciones que correspondan en caso de que no se cuente con los medios técnicos, financieros, logísticos o de infraestructura suficientes o apropiados.

#### Cuadro 14. Principales insecticidas utilizados en la lucha antivectorial y mecanismos de resistencia asociados

CLASE DE INSECTICIDA	DIANA BIOQUÍMICA				MECANISMOS DE RESISTENCIA CONOCIDOS							
					MUTACIONES SOBRE EL SITIO DE DIANA				MECANISMOS METABÓLICOS			
	Canales de sodio	AChE	Receptores del GABA	Receptores de la ACh	kdr	ace-1	rdl	Nla	COE	GST	P450	
Organoclorados	X				++					++	+	
Ciclodienos			X				++				+	
Organofosforados		X				++			++	+	+	
Carbamatos		X				++					+	
Neonicotinoides				X				+	++		++	
Piretroides	X				++				+	+	++	
Fenilpirazoles			X				++				+	
Avermectinas			X		Se desconoce						+	
Análogos de hormonas juveniles	Receptores hormonales y ruta biosintética de la quitina				Mutaciones sobre el sitio de acción							+
Toxinas del Bti	Receptores de la pared intestinal de las larvas de mosquito				Mutaciones de los receptores				Mecanismos probables: alteración de las toxinas, inmunidad			
Toxina del Bs												

**Nota:**

ace-1: gen codificador de la acetilcolinesterasa. ACh: acetilcolina. AChE: acetilcolinesterasa. Bs: botulínica. Bti: toxina producida por bacterias *Bacillus thuringiensis* subespecie israelensis. COE: carboxilesterasa. GST: glutatión-S-transferasa. kdr: gen de resistencia al derribo. Nla: subunidad del receptor nicotínico de la acetilcolina. rdl: gen de resistencia a la dieldrina. X: indica correspondencia entre la clase de insecticidas y la diana bioquímica. + o ++ indica la intensidad de la asociación entre el mecanismo de resistencia y la resistencia fenotípica a la clase de insecticidas.

**Fuente:** Organización Mundial de la Salud. Manual for monitoring insecticide resistance in mosquito vectors and selecting appropriate interventions [Internet]. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/356964>.

# Manejo y utilización de los datos de vigilancia de la resistencia a los insecticidas

La vigilancia de la resistencia a los insecticidas es parte importante del sistema de vigilancia entomológica y contribuye de manera determinante en la toma de decisiones para proteger a la población contra las enfermedades transmitidas por vectores. La información obtenida a partir del monitoreo rutinario de la susceptibilidad de los mosquitos a los insecticidas ayuda a comprender la dinámica del uso de los insecticidas en un determinado territorio y su efecto sobre las poblaciones de mosquitos presentes y, por lo tanto, en el ciclo de transmisión de las enfermedades, además de ser fundamental para elaborar estrategias de aplicación adecuadas que retrasen la aparición de resistencia y seleccionar intervenciones sustitutivas cuando se detecte esta última (1).

En los programas de lucha contra los vectores es importante que se impulse el desarrollo de sistemas de gestión de la información oportunos, sostenibles y robustos, que tengan bien definidos y normados los procesos de recolección, consolidación y análisis de los datos de vigilancia de la resistencia a los insecticidas. De igual forma, es imprescindible desarrollar medios de socialización de la información a través de visualizaciones que ayuden en el análisis de la información para la toma de decisiones. Los datos deben interpretarse juntamente con los de seguimiento del control de vectores, los epidemiológicos y otros tipos de datos pertinentes a fin de determinar la repercusión de la resistencia a los insecticidas en la lucha contra la enfermedad y orientar las decisiones programáticas (1).

La información generada durante la realización de las pruebas debe ser analizada por un equipo intersectorial e interdisciplinar para establecer los alcances epidemiológicos, entomológicos y técnico-operativos de los resultados. Los responsables de la toma de decisiones basadas en los resultados de las pruebas de susceptibilidad e intensidad de la resistencia a los insecticidas no solo podrán identificar las tareas a realizarse en torno al uso racional de insecticidas, sino que también podrán mejorar y fortalecer la estructuración de los planes nacionales de resistencia a insecticidas, así como también identificar las estrategias para la vigilancia de la resistencia a los insecticidas que orienten la selección adecuada de intervenciones para la vigilancia entomológica y el control vectorial (1,11). Para más información acerca de la selección de intervenciones de vigilancia entomológica y para el control de vectores recomendadas por la OMS, véanse los documentos técnicos desarrollados por la OPS (12,13) y la OMS, dirigidos a diferentes enfermedades de transmisión vectorial como la malaria (14), el dengue (15-17) y la filariasis linfática (18).

A continuación, se presentan algunos de los aspectos más relevantes sobre la utilidad de los datos de vigilancia de la resistencia a los insecticidas (1):

- Facilitar la selección de intervenciones para el control de vectores apropiadas.
- Orientar las indicaciones para modificar las intervenciones de control vectorial o cambiar los pesticidas en caso de detección de resistencia.
- Orientar la implementación de intervenciones novedosas o complementarias para el control de vectores.
- Apoyar y orientar la elaboración, adaptación e implementación de estrategias de manejo de la resistencia a insecticidas en zonas que implementen intervenciones de control de vectores basadas en el uso de insecticidas.
- Contribuir en la identificación de áreas de investigación sobre las variaciones de la transmisión de las enfermedades transmitidas por vectores, la carga de morbilidad y las tendencias de la resistencia a los insecticidas.



# Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. Manual for monitoring insecticide resistance in mosquito vectors and selecting appropriate interventions [Internet]. Ginebra: OMS; 2022 [citado el 12 de septiembre del 2022]. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/356964>.
2. Organización Mundial de la Salud. Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors (GPIRM) [Internet]. Ginebra: OMS; 2012 [citado el 7 de septiembre del 2022]. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44846>.
3. Organización Mundial de la Salud. Procedimientos de las pruebas para la vigilancia de la resistencia a los insecticidas en los mosquitos vectores del paludismo [Internet]. Ginebra: OMS; 2017 [citado el 7 de septiembre del 2022]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/258960>.
4. Organización Mundial de la Salud. Monitoring and managing insecticide resistance in Aedes mosquito populations: interim guidance for entomologists [Internet]. Ginebra: OMS; 2016 [citado el 7 de septiembre del 2022]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204588>.
5. Organización Mundial de la Salud. Division of Vector Biology and Control. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Ginebra: OMS; 1981 [citado el 7 de septiembre del 2022]. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69615>.
6. Organización Mundial de la Salud. Standard operating procedure for testing insecticide susceptibility of adult mosquitoes in WHO tube tests. SOP version: WHO Tube test/01/14 January 2022. Ginebra: OMS; 2022 [citado el 7 de septiembre del 2022]. Disponible en <https://www.who.int/publications/i/item/9789240043831>.
7. Organización Mundial de la Salud. Standard operating procedure for testing insecticide susceptibility of adult mosquitoes in WHO bottle bioassays. SOP version: WHO Bottle-bioassay/01/14 January 2022. Ginebra: OMS; 2022 [citado el 9 de septiembre del 2022]. Disponible en <https://www.who.int/publications/i/item/9789240043770>.
8. Organización Mundial de la Salud. Standard operating procedure for determining the ability of PBO to restore susceptibility of adult mosquitoes to pyrethroid insecticides in WHO tube tests. WHO SOP version: PBO-insecticide synergist bioassay/01/14 January 2022. Ginebra: OMS; 2022 [citado el 5 de septiembre del 2022]. Disponible en <https://www.who.int/publications/i/item/9789240043855>.
9. Organización Mundial de la Salud. Standard operating procedure for evaluating the sterilizing properties of pyriproxyfen in adult female mosquitoes in WHO bottle bioassays. SOP version: PPXN-Bioassay/01/14 January 2022. Ginebra: OMS; 2022 [citado el 7 de septiembre del 2022]. Disponible en <https://www.who.int/publications/i/item/9789240043794>.
10. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Instrucciones para la evaluación de la resistencia a insecticida en vectores mediante el ensayo biológico de la botella de los CDC. Atlanta: CDC; 2010 [citado el 5 de septiembre del 2022]. Disponible en [https://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/fsp/ir\\_manual/ir\\_cdc\\_bioassay\\_es.pdf](https://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/fsp/ir_manual/ir_cdc_bioassay_es.pdf).
11. Organización Mundial de la Salud. Estructura general de un plan nacional de monitoreo y manejo de la resistencia a insecticidas en vectores del paludismo [Internet]. Ginebra: OMS; 2017 [citado el 12 de septiembre del 2022]. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/258512>.
12. Organización Panamericana de la Salud. Métodos de vigilancia entomológica y control de los principales vectores en las Américas. Washington, D.C.: OPS; 2021 [citado el 11 de septiembre del 2022]. Disponible en <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55241>.
13. Organización Panamericana de la Salud. Documento operativo de aplicación del manejo integrado de vectores adaptado al contexto de las Américas. Washington, D.C.: OPS; 2019 [citado el 11 de septiembre del 2022]. Disponible en <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51760>.
14. Organización Mundial de la Salud. WHO guidelines for malaria, 3 de junio del 2022. Ginebra: OMS; 2022 [citado el 12 de septiembre del 2022]. Disponible en <https://www.who.int/publications/i/item/guidelines-for-malaria>.
15. Organización Mundial de la Salud. Dengue. Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Ginebra: OMS; 2009 [citado el 12 de septiembre del 2022]. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44504>.
16. Organización Panamericana de la Salud. Manual para aplicar rociado residual intradomiciliario en zonas urbanas para el control de Aedes aegypti. Washington, D.C.: OPS; 2019 [citado el 11 de septiembre del 2022]. Disponible en <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51638>.

17. Organización Panamericana de la Salud. Documento técnico para la implementación de intervenciones basado en escenarios operativos genéricos para el control del *Aedes aegypti*. Washington, D.C.: OPS; 2019 [citado el 11 de septiembre del 2022]. Disponible en <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51654>.
18. Organización Mundial de la Salud. Lymphatic filariasis: a handbook for national elimination programmes. Ginebra: OMS, 2013 [citado el 11 de septiembre del 2022]. Disponible en <https://docslib.org/doc/10395782/lymphatic-filariasis-a-handbook-for-national-elimination-programmes>.

# Anexo 1.

## Dosis de insecticidas (discriminante y de intensidad) para determinar la susceptibilidad de mosquitos *Anopheles* spp., *Aedes* spp. y *Culex* spp. adultos usando las pruebas de la Organización Mundial de la Salud

### A. Concentraciones discriminantes de insecticidas para los bioensayos de susceptibilidad de la OMS con mosquitos *Anopheles*

CLASE DE INSECTICIDA O SINERGISTA	MÉTODO DE ENSAYO	INSECTICIDA	ESPECIES PARA LAS QUE SE HAN VALIDADO CONCENTRACIONES DISCRIMINANTES	CONCENTRACIÓN DISCRIMINANTE <sup>a</sup>	INTENSIDAD DE LA CONCENTRACIÓN DISPONIBLE EN PAPELES DE FILTRO <sup>b</sup>	PERÍODO DE EXPOSICIÓN	PERÍODO DE RETENCIÓN	ACEITE TRANSPORTADOR, DISOLVENTE O TENSIOACTIVO
Piretroides	Prueba en tubos	Alfacipermetrina	<i>An. funestus</i> s.s., <i>An. gambiae</i> s.s., <i>An. minimus</i>	0,05%	5× y 10×	1 h	24 h	Aceite de silicona
			<i>An. albimanus</i> , <i>An. stephensi</i>	0,30% <sup>c</sup>		1 h	24 h	Aceite de silicona
		Ciflutrina	<i>An. aconitus</i> , <i>An. albimanus</i> , <i>An. arabiensis</i> , <i>An. dirus</i> , <i>An. freeborni</i> , <i>An. gambiae</i> s.s., <i>An. maculatus</i> , <i>An. minimus</i> , <i>An. stephensi</i>	0,15%	5× y 10×	1 h	24 h	Aceite de silicona
		Deltametrina	<i>An. aconitus</i> , <i>An. albimanus</i> , <i>An. arabiensis</i> , <i>An. dirus</i> , <i>An. freeborni</i> , <i>An. gambiae</i> s.s., <i>An. maculatus</i> , <i>An. minimus</i> , <i>An. stephensi</i>	0,05%	5× y 10×	1 h	24 h	Aceite de silicona
		Etofenprox	<i>An. aconitus</i> , <i>An. albimanus</i> , <i>An. arabiensis</i> , <i>An. dirus</i> , <i>An. freeborni</i> , <i>An. gambiae</i> s.s., <i>An. maculatus</i> , <i>An. stephensi</i>	0,50%	5× y 10×	1 h	24 h	Aceite de silicona
		Lambdacialotrina	<i>An. aconitus</i> , <i>An. albimanus</i> , <i>An. arabiensis</i> , <i>An. dirus</i> , <i>An. freeborni</i> , <i>An. gambiae</i> s.s., <i>An. maculatus</i> , <i>An. minimus</i> , <i>An. stephensi</i>	0,05%	5× y 10×	1 h	24 h	Aceite de silicona
			<i>An. sacharovi</i>	0,10%		1 h	24 h	Aceite de silicona
	Permetrina (relación de isómeros cis/trans: 40:60)	<i>An. aconitus</i> , <i>An. albimanus</i> , <i>An. arabiensis</i> , <i>An. dirus</i> , <i>An. freeborni</i> , <i>An. gambiae</i> s.s., <i>An. maculatus</i> , <i>An. minimus</i> , <i>An. stephensi</i>	0,75%	5× y 10×	1 h	24 h	Aceite de silicona	
Bioensayo en botellas	Transflutrina	<i>An. albimanus</i> , <i>An. stephensi</i> , <i>An. funestus</i> , <i>An. minimus</i> , <i>An. gambiae</i> s.s.	2 µg/botella	-	1 h	24 h	Acetona sola	

CLASE DE INSECTICIDA O SINERGISTA	MÉTODO DE ENSAYO	INSECTICIDA	ESPECIES PARA LAS QUE SE HAN VALIDADO CONCENTRACIONES DISCRIMINANTES	CONCENTRACIÓN DISCRIMINANTE <sup>a</sup>	INTENSIDAD DE LA CONCENTRACIÓN DISPONIBLE EN PAPELES DE FILTRO <sup>b</sup>	PERÍODO DE EXPOSICIÓN	PERÍODO DE RETENCIÓN	ACEITE TRANSPORTADOR, DISOLVENTE O TENSIÓACTIVO
Carbamatos		Bendiocarb	ND	0,10%	5× y 10×	1 h	24 h	Aceite de oliva
		Carbosulfán	ND	0,40% <sup>d,e</sup>	–	1 h	24 h	Aceite de oliva
		Propoxur	ND	0,10% <sup>e</sup>	–	1 h	24 h	Aceite de oliva
Organoclorados		DDT	ND	4,00%	–	1 h	24 h	Aceite de <i>Risella</i>
		Dieldrina	ND	4,00% / 0,4% <sup>e, f</sup>	–	1 h	24 h	Aceite de <i>Risella</i>
Organofosforados	Prueba en tubos	Fenitrotión	ND	1,00% <sup>e</sup>	–	2 h	24 h	Aceite de oliva
		Malatión	ND	5,00%	–	1 h	24 h	Aceite de oliva
		Pirimifos-metil	<i>An. albimanus</i> , <i>An. stephensi</i> , <i>An. minimus</i> , <i>An. funestus</i> s.s.	100 mg/m <sup>2</sup> <sup>c</sup>	–	1 h	24 h	Acetona sola
			<i>An. gambiae</i> s.s.	170 mg/m <sup>2</sup> <sup>c</sup>	–	1 h	24 h	Acetona sola
Sinergista		Butóxido de piperonilo	ND	4,00%	–	1 h	24 h	Aceite de silicona
Neonicotinoides	Bioensayo en botellas	Clotianidina	<i>An. albimanus</i> , <i>An. stephensi</i>	10 µg/botella	–	1 h	24 h	Acetona + 800 ppm de Mero
			<i>An. funestus</i> s.s., <i>An. gambiae</i> s.s.	4 µg/botella	–	1 h	24 h	Acetona + 800 ppm de Mero
			<i>An. minimus</i>	6 µg/botella	–	1 h	24 h	Acetona + 800 ppm de Mero
Butenólidos		Flupiradifurona	<i>An. albimanus</i>	500 µg/botella	–	1 h	24 h	Acetona + 200 ppm de Mero
			<i>An. stephensi</i> , <i>An. gambiae</i> s.s.	60 µg/botella	–	1 h	24 h	Acetona + 200 ppm de Mero
			<i>An. funestus</i> s.s., <i>An. minimus</i>	100 µg/botella	–	1 h	24 h	Acetona + 200 ppm de Mero

**Notas:**

- a** Prueba en tubos: CD expresada en porcentaje (en el caso del Pirimifos-metil, en mg/m<sup>2</sup>). Bioensayo en botellas: CD en µg/botella (250 ml).
- b** Estas concentraciones de intensidad no han sido validadas por la Organización Mundial de la Salud, pero los papeles impregnados con concentraciones de intensidad de piretroides están disponibles para su adquisición en Universidad de Ciencias de Malasia con fines de investigación.
- c** Estas CD reemplazan a la concentración provisional indicada en la segunda edición de los Procedimientos de las pruebas para la vigilancia de la resistencia a los insecticidas en los mosquitos vectores del paludismo, publicados por la Organización Mundial de la Salud y disponibles en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/258960>. Los resultados obtenidos con esa concentración provisional deben validarse frente a estas nuevas CD.
- d** Provisional, requiere confirmación. Basada en datos publicados por N'Guessan R, Darriet F, Guillet P, Carnevale P, Traore-Lamizana M, Corbel V, et al. Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. Med Vet Entomol. 2003;17(1):19-25. Disponible en <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2003.00406.x>; y Ahoua Alou LP, Koffi AA, Adja MA, Tia E, Kouassi PK, Kone M, et al. Distribution of ace-1<sup>R</sup> and resistance to carbamates and organophosphates in *Anopheles gambiae* s.s. populations from Côte d'Ivoire. Malar J. 2010;9(1):167. Disponible en <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-167>.
- e** La Universidad de Ciencias de Malasia ya no suministra estos papeles impregnados.
- f** La exposición a la dieldrina al 0,4% mata a los mosquitos susceptibles, pero no a los heterocigotos resistentes; la exposición a la dieldrina al 4% mata a los heterocigotos resistentes, pero no a los homocigotos. Véase Organización Mundial de la Salud. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bioefficacy and persistence of insecticides on treated surfaces: report of the WHO informal consultation, Ginebra, 28-30 de septiembre de 1998. Ginebra: OMS; 1998. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/64879>.

–: no disponible. CD: concentración discriminante. DDT: dicloro difenil tricloroetano. Mero: éster metílico de aceite de colza al 81% (fabricado por Bayer CropScience). ND: no se dispone de datos sobre especies concretas.

**Fuente:** Organización Mundial de la Salud. Manual for monitoring insecticide resistance in mosquito vectors and selecting appropriate interventions [Internet]. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/356964>.

## B. Concentraciones discriminantes de insecticidas para los bioensayos de susceptibilidad de la Organización Mundial de la Salud con mosquitos *Aedes*

CLASE DE INSECTICIDA	MÉTODO DE ENSAYO	INSECTICIDA	ESPECIES PARA LAS QUE SE HAN VALIDADO CONCENTRACIONES DISCRIMINANTES	CONCENTRACIÓN DISCRIMINANTE <sup>a</sup>	PERÍODO DE EXPOSICIÓN	PERÍODO DE RETENCIÓN	ACEITE TRANSPORTADOR, DISOLVENTE O TENSIÓACTIVO
Piretroides	Prueba en tubos	Alfacipermetrina	<i>Ae. aegypti</i>	0,05% <sup>b</sup>	1 h	24 h	Aceite de silicona
			<i>Ae. albopictus</i>	0,08% <sup>b</sup>	1 h	24 h	Aceite de silicona
		Deltametrina	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i>	0,03% <sup>b</sup>	1 h	24 h	Aceite de silicona
		Lambdacialotrina	<i>Ae. aegypti</i>	0,05% <sup>b</sup>	1 h	24 h	Aceite de silicona
			<i>Ae. albopictus</i>	0,08% <sup>b</sup>	1 h	24 h	Aceite de silicona
	Permetrina (relación de isómeros cis/trans: 40:60)	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i>	0,40% <sup>b</sup>	1 h	24 h	Aceite de silicona	
	Bioensayo en botellas	Transflutrina	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i>	3 µg/botella	1 h	24 h	Acetona sola
		Metoflutrina	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i>	1 µg/botella	1 h	24 h	Acetona sola
Praletrina		<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i>	30 µg/botella	1 h	24 h	Acetona sola	
Carbamatos	Prueba en tubos	Bendiocarb	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i>	0,20%	1 h	24 h	Aceite de oliva
		Propoxur	<i>Ae. aegypti</i>	0,10% <sup>c</sup>	1 h	24 h	Aceite de oliva
Organofosforados		Clorpirifós-etilo	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i>	1,00%	1 h	24 h	Aceite de oliva
		Pirimifos-metil	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i>	60 mg/m <sup>2</sup> <sup>b</sup>	1 h	24 h	Acetona sola
		Malatión	<i>Ae. aegypti</i>	1,50% <sup>b</sup>	1 h	24 h	Aceite de oliva
<i>Ae. albopictus</i>	5,00% <sup>b</sup>		1 h	24 h	Aceite de oliva		
Neonicotinoides	Bioensayo en botellas	Clotianidina	<i>Ae. aegypti</i>	20 µg/botella	1 h	24 h	Acetona + 1500 ppm de Mero
			<i>Ae. albopictus</i>	10 µg/botella	1 h	24 h	Acetona + 1500 ppm de Mero
Butenóolidos		Flupiradifurona	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i>	80 µg/botella	1 h	24 h	Acetona + 1500 ppm de Mero

**Notas:**

<sup>a</sup> Prueba en tubos: CD expresada en porcentaje. Bioensayo en botellas: CD en µg/botella (250 ml).

<sup>b</sup> Estas CD reemplazan a la concentración provisional indicada en la segunda edición de los *Procedimientos de las pruebas para la vigilancia de la resistencia a los insecticidas en los mosquitos vectores del paludismo*, publicados por la Organización Mundial de la Salud y disponibles en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/258960>. Los resultados obtenidos con esa concentración provisional deben validarse frente a estas nuevas CD.

<sup>c</sup> La Universidad de Ciencias de Malasia ya no suministra estos papeles impregnados.

CD: concentración discriminante. Mero: éster metílico de aceite de colza al 81% (fabricado por Bayer CropScience).

Fuente: Organización Mundial de la Salud. Manual for monitoring insecticide resistance in mosquito vectors and selecting appropriate interventions [Internet]. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/356964>.



### C. Concentraciones discriminantes de insecticidas para los bioensayos de susceptibilidad de la Organización Mundial de la Salud con mosquitos *Culex*

CLASE DE INSECTICIDA	MÉTODO DE ENSAYO	INSECTICIDA	ESPECIES PARA LAS QUE SE HAN VALIDADO CONCENTRACIONES DISCRIMINANTES	CONCENTRACIÓN DISCRIMINANTE	PERÍODO DE EXPOSICIÓN	PERÍODO DE RETENCIÓN	ACEITE TRANSPORTADOR
Organoclorados	Prueba en tubos	DDT	<i>Culex quinquefasciatus</i> <sup>a</sup>	0,04%	4 h	24 h	Aceite de <i>Risella</i>
Piretroides		Deltametrina <sup>a</sup>		0,025%	1 h	24 h	Aceite de silicona
		Lambdacialotrina		0,025%	1 h	24 h	Aceite de silicona
		Permetrina (relación de isómeros cis/trans: 40:60)		0,25%	3 h	24 h	Aceite de silicona
Carbamatos		Propoxur <sup>b</sup>		0,10%	1 h	24 h	Aceite de oliva
Organoclorados		Fenitrotión <sup>b</sup>		1%	2 h	24 h	Aceite de oliva
		Malatión <sup>a</sup>		5%	1 h	24 h	Aceite de oliva

Notas:

<sup>a</sup> La Organización Mundial de la Salud está reevaluando actualmente estas concentraciones.

<sup>b</sup> La Universidad de Ciencias de Malasia ya no suministra estos papeles impregnados.

DDT: dicloro difenil tricloroetano.

Fuente: Organización Mundial de la Salud. Manual for monitoring insecticide resistance in mosquito vectors and selecting appropriate interventions [Internet]. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/356964>.

# Anexo 2.

## Kits para pruebas de susceptibilidad a los insecticidas de la Organización Mundial de la Salud

En coordinación con la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la Unidad de Investigación para el Control de los Vectores de la Universidad de Ciencias de Malasia (USM) produce y suministra kits, papeles impregnados con insecticidas y otros materiales para realizar los ensayos normalizados de susceptibilidad de la Organización Mundial de la Salud (OMS) con mosquitos adultos o larvas, los cuales pueden solicitarse mediante el catálogo y la hoja de pedido que figuran en:

- Sitio web de la OMS:
  - <https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/interventions/strategies/vector-control/insecticide-resistance>.
  - <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/prevention/vector-control/insecticide-resistance>.
- Sitio web de la USM:
  - <https://inreskit.usm.my/>.

En el sitio web de la USM se indican los procedimientos de adquisición de kits y materiales para realizar los ensayos. Los papeles impregnados de insecticida vienen empacados en cajas de plástico, cada una de las cuales contiene ocho hojas de 12 cm × 15 cm.

Se recomienda consultar regularmente el sitio web del Plan de Evaluación de Plaguicidas de la OMS<sup>1</sup> para obtener información actualizada sobre los papeles de ensayo y aprovechar todo el material que se ofrece. A través del sitio web de la USM también se pueden encargar papeles impregnados de insecticida a concentraciones seriadas (5× y 10×).<sup>2</sup>

### Composición del kit de prueba de la Organización Mundial de la Salud

1. 12 tubos de plástico (125 mm de longitud y 44 mm de diámetro), cada uno de ellos con una malla, en un extremo, de tamiz 16:
  - 4 tubos marcados con un punto rojo que se utilizarán como tubos de exposición.
  - 2 tubos marcados con un punto amarillo que se utilizarán como tubos de control sin insecticida.
  - 6 tubos marcados con un punto verde que se utilizarán como tubos de mantenimiento.
2. 6 unidades deslizantes, cada una con tapón a rosca en ambos lados y un orificio de llenado de 15 mm de diámetro.
3. 40 hojas de papel blanco limpio (12 × 15 cm) para forrar los tubos de mantenimiento.
  - 12 clips metálicos (6 de acero y 6 de cobre) para mantener el papel fijado a la pared de los tubos: los 6 clips de acero se utilizan con los 6 tubos de mantenimiento (punto verde), y los 6 clips de cobre se utilizan con los 4 tubos de exposición (punto rojo) y los 2 tubos de control (punto amarillo).
4. 2 tubos aspiradores de vidrio de 12 mm de diámetro interno, junto con una manguera de goma de 60 cm de longitud y dos boquillas.
5. 1 rollo de cinta adhesiva.
6. 1 hoja de instrucciones.
7. 1 formulario de registro.
8. 1 hoja de papel logarítmico.
9. 1 etiqueta.

*Fuente:* Organización Mundial de la Salud. Manual for monitoring insecticide resistance in mosquito vectors and selecting appropriate interventions [Internet]. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/356964>.

1 Organización Mundial de la Salud. Supplies for monitoring insecticide resistance in disease vectors: procedures and conditions. Ginebra: OMS; 2002. Disponible en [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70079/WHO\\_CDS\\_CPE\\_PVC\\_2001.2\\_eng.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70079/WHO_CDS_CPE_PVC_2001.2_eng.pdf?sequence=1).

2 Universidad de Ciencias de Malasia. Sitio web. [Internet]. Disponible en <https://inreskit.usm.my/>.

# Anexo 3.

## Conservación de los papeles impregnados

Algunos de los aspectos más importantes para conservar los papeles impregnados son:<sup>3</sup>

- Los papeles impregnados y los de control deben conservarse a una temperatura de 4-8 °C, en un armario isotérmico o un refrigerador.
- De ser posible, mantener un registro de datos de temperatura en el armario para el seguimiento continuo de las variaciones de temperatura durante el almacenamiento prolongado.
- Si los papeles impregnados se conservan a 4-8 °C, su período de validez oscila entre 2 y 5 años según el insecticida.<sup>4</sup>
- Una hora antes de realizar el ensayo se debe sacar la caja con papeles impregnados del armario isotérmico o el refrigerador y, sin abrirla, dejar que alcance temperatura ambiente. Así se evita la condensación de agua en la superficie de los papeles por el riesgo de que, al abrir la caja inmediatamente, el insecticida se pueda hidrolizar.
- Los papeles de los ensayos nunca deben exponerse a la luz solar directa ni a temperaturas superiores a 8 °C, salvo durante períodos cortos, o durante su envío o transporte.
- En la caja figura la fecha de caducidad de cada lote de papeles. No deben utilizarse los papeles luego de su fecha de caducidad.

En el cuadro A3 se indica el período de validez y la estabilidad en condiciones de almacenamiento acelerado de los insecticidas que habitualmente se someten a vigilancia de la resistencia.

**Cuadro A3. Período de validez en condiciones óptimas y estabilidad de papeles recién tratados en condiciones de temperatura acelerada**

CLASE	INSECTICIDA	PERÍODO DE VALIDEZ EN CONDICIONES ÓPTIMAS DE CONSERVACIÓN EN FRÍO (4-8 °C) (AÑOS)	ESTABILIDAD EN ALMACENAMIENTO ACCELERADO DE PAPELES RECIÉN TRATADOS (54 ± 2 °C DURANTE 2 SEMANAS O 40 ± 2 °C DURANTE 8 SEMANAS)
Organoclorados	p,p'-DDT	5	Estable
Organofosforados	Malatión	3 <sup>a</sup>	Estable <sup>a</sup>
	Pirimifos-metil	3 <sup>a</sup>	-
Carbamatos	Bendiocarb	3 <sup>a</sup>	-
Piretroides	Alfacipermetrina	2	Estable
	Ciflutrina	2	Estable
	Deltametrina	2	Estable
	Etofenprox	2	Estable
	Lambdacialotrina	2	Estable
Sinergista	Butóxido de piperonilo	3	Estable

Notas:

a Provisional (requiere reconfirmación).

-: En evaluación por la OMS. DDT: dicloro difenil tricloroetano.

////////////////////////////////////

3 Organización Mundial de la Salud. Manual for monitoring insecticide resistance in mosquito vectors and selecting appropriate interventions [Internet]. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/356964>.

4 Organización Mundial de la Salud. Within-paper variation and temperature storage stability of filter papers treated with active ingredients of organochlorine DDT, organophosphates, carbamates and piperonyl butoxide within their shelf-life, and for pyrethroid-treated papers within their extended shelf-life period [unpublished report]. Study n.º 24847. Ginebra: OMS; 2021.

## Conservación de papeles nuevos

Durante todo su período de validez, los papeles impregnados no utilizados deben conservarse en un refrigerador a 4-8 °C en sus cajas de plástico originales selladas con cinta adhesiva.

## Conservación de los papeles entre rondas de un ensayo

- Una vez utilizado un papel, en un borde de la cara no tratada del mismo debe anotarse con un lápiz la fecha de uso.
- Entre una ronda de ensayo de resistencia a insecticida y la siguiente, los aspectos que se deben cuidar con relación a los papeles reutilizables (aquellos que se han utilizado menos de seis veces) son:
  - Separar los papeles reutilizables de los usados con una hoja de papel aluminio.
  - Conservar los papeles reutilizables en su caja de plástico original, la que debe ser sellada con cinta adhesiva.
  - Mantener la caja en un recipiente isotérmico o un refrigerador a 4-8 °C o, en su defecto, en un armario fresco y sin luz.
- Conservar los papeles a temperaturas más elevadas durante largos períodos podría afectar su calidad.

## Conservación de los papeles entre una prueba y otra de la misma ronda del ensayo

- Para evitar una manipulación excesiva de los papeles impregnados cuando los bioensayos se lleven a cabo a lo largo de varios días, los tubos de exposición pueden ser conservados siempre y cuando cada uno de ellos esté envuelto con papel de aluminio después de cada uso y se asegure una temperatura de entre 4 °C y 8 °C.
- De no ser posible seguir las indicaciones anteriormente citadas, los tubos deben mantenerse en un lugar fresco y oscuro.
- Los tubos con papel impregnado que hayan sido envueltos en papel de aluminio y se hayan conservado en frío deben dejarse a temperatura ambiente durante una hora antes de retirar la envoltura de aluminio.

---

*Fuente:* Organización Mundial de la Salud. Manual for monitoring insecticide resistance in mosquito vectors and selecting appropriate interventions [Internet]. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/356964>.

# Anexo 4.

## Formulario de recogida de datos para evaluar la susceptibilidad de los mosquitos adultos a los insecticidas mediante pruebas en tubos de la OMS

Debe completarse con tinta negra o azul. No utilizar lápiz ni corrector líquido.

<b>Fecha (dd/mm/aaaa):</b>	<b>Nombre del técnico:</b>	
<b>Lugar de recolección de los mosquitos:</b>	<b>Coordenadas</b> Latitud: Longitud:	
<b>Período de recolección de los mosquitos:</b> Fecha de inicio (dd/mm/aaaa): Fecha de finalización (dd/mm/aaaa):	<b>Método de recolección:</b>	
<b>Insecticida evaluado y concentración:</b>	<b>Fecha de impregnación de los papeles (dd/mm/aaaa):</b>	<b>Número de veces que se han utilizado anteriormente los papeles:</b>
<b>Especie de mosquitos:</b>	<b>Generación y origen de los mosquitos:</b> Adultos F0 (de larvas silvestres), adultos F0 (silvestres recolectados), adultos F1 (de larvas silvestres), adultos F1 (descendencia de adultos silvestres)	
<b>Edad de las hembras (días):</b>	<b>Estado de alimentación:</b> Sin alimentar; alimentados con azúcar y sometidos a ayuno; otro (especificar)	
<b>Hora de inicio de la exposición (hh:mm):</b>	<b>Hora de finalización de la exposición (hh:mm):</b>	
<b>Temperatura durante la exposición y el período de retención (°C):</b> Máx.: Mín.:	<b>Humedad relativa durante la exposición y el período de retención (%):</b> Máx.: Mín.:	

	Tubo	N.º de mosquitos introducidos	N.º de mosquitos caídos tras 1 h de exposición	N.º de mosquitos muertos y de mosquitos vivos 24 h después de la hora de exposición		Mortalidad 24 h después de la hora de exposición
				N.º de muertos	N.º de vivos	Mortalidad (%)
Mosquitos silvestres expuestos a la concentración discriminante del insecticida	Tubo 1					
	Tubo 2					
	Tubo 3					
	Tubo 4					
Mosquitos silvestres de control	Tubo de control 1					
	Tubo de control 2					

### Resultados finales (todos los tubos)

	N.º de caídos tras 1 h de exposición (al finalizar la hora de exposición)	Mortalidad (%) (a las 24 h)	Mortalidad corregida (Abbott, %) (a las 24 h)
Mosquitos silvestres expuestos a la concentración discriminante del insecticida de la prueba			

Resultado de la prueba: La población de vectores es ..... (susceptible/resistente/posiblemente resistente) al insecticida.

Observaciones (si las hubiera):

.....  
 .....  
 .....

Verificado por el (la) supervisor(a): ..... Fecha: .....

Fuente: Organización Mundial de la Salud. Standard operating procedure for testing insecticide susceptibility of adult mosquitoes in WHO tube tests. SOP version: WHO Tube test/01/14 January 2022. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://www.who.int/publications/i/item/9789240043831>.

# Anexo 5.

## Formulario de recogida de datos para los bioensayos en botellas de la Organización Mundial de la Salud

Debe completarse con tinta negra o azul. No utilizar lápiz ni corrector líquido.

<b>Fecha del bioensayo (dd/mm/aa):</b>	<b>Nombre del técnico:</b>	
<b>País y lugar de recolección de los mosquitos:</b>	<b>Coordenadas</b> Latitud: _____ Longitud: _____	
<b>Período de recolección de los mosquitos:</b> Fecha de inicio: Fecha de finalización:	<b>Método de recolección:</b>	
<b>Insecticida evaluado y concentración:</b>	<b>Fecha de recubrimiento de las botellas (dd/mm/aa):</b>	<b>Número de veces que se han utilizado anteriormente las botellas recubiertas y las de control:</b>
	<b>Temperatura de conservación de las botellas</b> Máx.: _____ Mín.: _____	
<b>Especie de mosquitos:</b>	<b>Cepa de mosquitos:</b>	
<b>Edad de las hembras (días):</b>	<b>Estado de alimentación:</b> (sin alimentar; alimentados con azúcar y hambrientos; otro [especificar])	
<b>Hora de inicio de la exposición (hh/mm):</b>	<b>Hora de finalización de la exposición (hh/mm):</b>	
<b>Temperatura durante la exposición y el período de retención (°C):</b> Máx.: _____ Mín.: _____	<b>Humedad relativa durante la exposición y el período de retención (%):</b> Máx.: _____ Mín.: _____	

## Resultados por botella

Grupo de prueba	Botellas	N.º de mosquitos introducidos	N.º de mosquitos caídos tras 1 h de exposición	N.º de muertos 24 h después de 1 h de exposición	Mortalidad 24 h después de 1 h de exposición	[Clorfenapir] N.º de muertos 48 h después de 1 h de exposición	[Clorfenapir] N.º de muertos 72 h después de 1 h de exposición	[Clorfenapir] Mortalidad 72 h después de 1 h de exposición
Mosquitos silvestres expuestos a la CD del insecticida	Botella sil1							
	Botella sil2							
	Botella sil3							
	Botella sil4							
Mosquitos silvestres de control	Botella control sil1							
	Botella control sil2							
[Clorfenapir] Mosquitos susceptibles expuestos a la CD del insecticida	Botella sus1							
	Botella sus2							
	Botella sus3							
	Botella sus4							
[Clorfenapir] Mosquitos susceptibles de control (expuestos a la acetona)	Botella control sus1							
	Botella control sus2							



## Resultados finales (todas las botellas)

	Caídos (%)	Mortalidad (%)		Mortalidad corregida (Abbott, %)	
	Tras 1 h de exposición	24 h	72 h (clorfenapir)	24 h	72 h (clorfenapir)
Mosquitos silvestres expuestos a la CD del insecticida					
Mosquitos silvestres de control					

## Resultados de la prueba

La población de vectores es ..... (susceptible/resistente/posiblemente resistente) al insecticida.

Observaciones (si las hubiera):

.....

.....

.....

Verificado por el (la) supervisor(a): ..... Fecha: .....

*Notas:* CD: concentración discriminante. sil: silvestre. sus: susceptibles.

*Fuente:* Organización Mundial de la Salud. Standard operating procedure for testing insecticide susceptibility of adult mosquitoes in WHO bottle bioassays. SOP version: WHO Bottle-bioassay/01/14 January 2022. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://www.who.int/publications/i/item/9789240043770>.

# Anexo 6.

## Cálculos para la preparación de las disoluciones de los ensayos de la Organización Mundial de la Salud

### A. Cálculo de la cantidad de principio activo y de disolvente (acetona) necesaria para preparar la solución madre inicial y las diluciones posteriores a fin de obtener las concentraciones seriadas para el recubrimiento de las botellas

La hoja de cálculo de Excel puede descargarse en la siguiente dirección: <https://cdn.who.int/media/docs/default-source/ntds/vector-ecology-mangement/calculation-tables-paper-impregnation-bottles-17jan2022-locked.xlsx>.

Al introducir valores en las celdas verdes de la hoja de cálculo de Excel, se calcularán automáticamente los valores de las celdas blancas.

CLASE DE INSECTICIDA	TENSIOACTIVO	INSECTICIDA	CÁLCULO DEL PESO DE PA (GRAMOS) AJUSTADO SEGÚN SU PUREZA								CÁLCULO DEL PESO DE PA (MILIGRAMOS) AJUSTADO SEGÚN SU PUREZA							
			CONCENTRACIÓN DESEADA DE PA EN LAS BOTELLAS (MG/BOTELLA)	N.º DE BOTELLAS QUE SE HAN DE RECUBRIR	CANTIDAD DE TENSIOACTIVO POR BOTELLA (PPM O MG)*	PESO TOTAL DE TENSIOACTIVO NECESARIO (MG)	DENSIDAD DEL TENSIOACTIVO	VOLUMEN DE TENSIOACTIVO (ML)	VOLUMEN DE ACETONA (ML)	VOLUMEN TOTAL DE SOLUCIÓN DE RECUBRIMIENTO (ML)	CANTIDAD DE PA QUE SE HA DE PESAR PARA RECUBRIR LAS BOTELLAS (G)	PUREZA DEL PA INSECTICIDA (%)	CANTIDAD AJUSTADA DE PA QUE SE HA DE PESAR (G)*	PESO EXACTO DE PA (G)**	VOLUMEN TOTAL AJUSTADO DE SOLUCIÓN DE RECUBRIMIENTO (ML)***	CANTIDAD DE PA QUE SE HA DE PESAR (MG)**	PESO EXACTO DE PA (MG)***	VOLUMEN TOTAL AJUSTADO DE SOLUCIÓN DE RECUBRIMIENTO (ML)***
			A	B	C	D = (B × C) / 1000	E	F = (D / E) / 1000	G = (B × 1) - F	H = F + G	I = (A × B) / 10 <sup>6</sup>	J	K = I × (100 / J)	L	M = (L × H) / K	N = K × 1000	O	P = (O × H) / N
P.ej., Mero <sup>a</sup>				1	800	0,8	0,900	0,001	1,00	1	0,000000	99,2	0,000000		#DIV/0	0,00	1	#DIV/0
	Control			1	800	0,8	0,900	0,001	1,00	1								
Ninguno <sup>b</sup>				1					1,00	1	0,000000	99,8	0,000000		#DIV/0	0,00	1	#DIV/0
	Control			1					1,00	1								

Notas:

\* Teniendo en cuenta la pureza del PA insecticida.

\*\* Peso exacto de PA indicado en la balanza electrónica.

\*\*\* Volumen ajustado según el peso exacto de PA; utilizar 1 ml de solución para recubrir una botella de 250 ml.

<sup>a</sup> Por ejemplo, clotianidina.

<sup>b</sup> Con acetona sola como disolvente; por ejemplo, clorfenapir y piriproxifeno.

Mero<sup>o</sup>: éster metílico de aceite de colza al 81%. PA: principio activo.

## B. Diluciones de la solución madre con acetona a fin de obtener las concentraciones seriadas del insecticida para el recubrimiento de las botellas

La hoja de cálculo de Excel puede descargarse en la siguiente dirección: <https://cdn.who.int/media/docs/default-source/ntds/vector-ecology-mangement/calculation-tables-paper-impregnation-bottles-17jan2022-locked.xlsx>.

Al introducir valores en las celdas verdes de la hoja de cálculo de Excel, se calcularán automáticamente los valores de las celdas blancas.

A. CON ACETONA SOLA (ES DECIR, SIN UN TENSIOLACTIVO; POR EJEMPLO, CLORFENAPIR Y PIRIPROXIFENO)					
	CONCENTRACIÓN FINAL DE PA (MG/M <sup>2</sup> )**	VOLUMEN FINAL DE ACETONA (ML)*	CONCENTRACIÓN DE PA DE LA SOLUCIÓN MADRE INICIAL (MG/M <sup>2</sup> )**	VOLUMEN DE LA SOLUCIÓN MADRE INICIAL QUE SE HA DE TOMAR (ML)	VOLUMEN DE ACETONA QUE SE HA DE AÑADIR (ML)
	a	b	c	d = (a x b) / c	e = b - d
Solución madre*			100		
Dilución seriada n.º 1	50	5	100	2,50	2,50
Dilución seriada n.º 2	30	5	100	1,50	3,50
Dilución seriada n.º 3	20	5	100	1,00	4,00
Dilución seriada n.º 4	10	5	100	0,50	4,50
Dilución seriada n.º 5	5	5	100	0,25	4,75

79

B. CON ACETONA Y UN TENSIOLACTIVO (COMO MERO®); POR EJEMPLO, CLOTIANIDINA					
	CONCENTRACIÓN FINAL DE PA (MG/BOTELLA)	VOLUMEN FINAL DE ACETONA + TENSIOLACTIVO (ML)**	CONCENTRACIÓN DE PA DE LA SOLUCIÓN MADRE INICIAL (MG/BOTELLA)	VOLUMEN DE LA SOLUCIÓN MADRE INICIAL QUE SE HA DE TOMAR (ML)	VOLUMEN FINAL DE ACETONA + TENSIOLACTIVO QUE SE HA DE AÑADIR (ML)
	a	b	c	d = (a x b) / c	e = b - d
Solución madre*			100		
Dilución seriada n.º 1	50	5	100	2,50	2,50
Dilución seriada n.º 2	30	5	100	1,50	3,50
Dilución seriada n.º 3	20	5	100	1,00	4,00
Dilución seriada n.º 4	10	5	100	0,50	4,50
Dilución seriada n.º 5	5	5	100	0,25	4,75

**Notas:**

\* La solución madre inicial se prepara pesando la cantidad adecuada de PA y ajustando el volumen requerido de disolvente (acetona).

\*\* Preparar el volumen final según el número de botellas que se han de recubrir (por ejemplo, para recubrir cuatro botellas se necesita un volumen de 5 ml, teniendo en cuenta las posibles pérdidas de solución durante el procedimiento).

Mero®: éster metílico de aceite de colza al 81%. PA: principio activo.

Fuente: Organización Mundial de la Salud. Manual for monitoring insecticide resistance in mosquito vectors and selecting appropriate interventions [Internet]. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/356964>.

## Anexo 7.

### Formulario recogida de datos para determinar la capacidad del butóxido de piperonilo de restablecer la susceptibilidad a los insecticidas piretroides mediante pruebas en tubos de la Organización Mundial de la Salud

Debe completarse con tinta negra o azul. No utilizar lapiz ni corrector líquido.

<b>Fecha (dd/mm/aaaa):</b>	<b>Nombre del técnico:</b>	
<b>Lugar de recolección de los mosquitos:</b>	<b>Coordenadas</b> Latitud:	Longitud:
<b>Período de recolección de los mosquitos:</b> Fecha de inicio (dd/mm/aaaa): Fecha de finalización (dd/mm/aaaa):	<b>Método de recolección:</b>	
<b>Piretroide evaluado y concentración:</b>	<b>Fecha de impregnación de los papeles con el piretroide (dd/mm/aaaa):</b>	<b>Número de veces que se han utilizado anteriormente los papeles con el piretroide:</b>
<b>Sinergista evaluado y concentración:</b>	<b>Fecha de impregnación de los papeles con el sinergista (dd/mm/aaaa):</b>	<b>Número de veces que se han utilizado anteriormente los papeles con el sinergista:</b>
<b>Especie de mosquitos:</b>	<b>Generación y origen de los mosquitos:</b> Adultos F0 (de larvas silvestres), adultos F0 (silvestres recolectados), adultos F1 (de larvas silvestres), adultos F1 (descendencia de adultos silvestres)	
<b>Edad de las hembras (días):</b>	<b>Estado de alimentación:</b> Sin alimentar; alimentados con azúcar y sometidos a ayuno; otro (especificar)	
<b>Hora de inicio de la exposición (hh:mm):</b>	<b>Hora de finalización de la exposición (hh:mm):</b>	
<b>Temperatura durante la exposición y el período de retención (°C):</b> Máx.:                      Mín.:	<b>Humedad relativa durante la exposición y el período de retención (%):</b> Máx.:                      Mín.:	

Grupo de prueba	N.º de mosquitos introducidos	N.º de mosquitos caídos tras 1 h de exposición	N.º de mosquitos muertos y de mosquitos vivos 24 h después de la exposición			
			N.º de muertos	N.º de vivos	Mortalidad	Mortalidad corregida (Abbott)
Grupo "Solo BOP"						
Grupo de control						
Grupo "Solo piretroide"						
Grupo "BOP + piretroide"						

## Resultado final

<b>Diferencia entre la mortalidad con BOP solo y con BOP + piretroide (tras la corrección de Abbott, si es necesaria)</b>	
<b>Restablecimiento de la susceptibilidad al piretroide: total, parcial o nulo (véase el capítulo 9)</b>	

Observaciones (si las hubiera):

.....

.....

.....

Verificado por el (la) supervisor(a): ..... Fecha: .....

*Fuente:* Organización Mundial de la Salud. Standard operating procedure for determining the ability of PBO to restore susceptibility of adult mosquitoes to pyrethroid insecticides in WHO tube tests. WHO SOP version: PBO-insecticide synergist bioassay/01/14 January 2022. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://www.who.int/publications/i/item/9789240043855>.

# Anexo 8.

## Formulario de recogida de datos para los bioensayos en botellas con piriproxifeno de la Organización Mundial de la Salud

Debe completarse con tinta negra o azul. No utilizar lápiz ni corrector líquido.

<b>Fecha del bioensayo (dd/mm/aa):</b>	<b>Nombre del técnico:</b>	
<b>Lugar de recolección de los mosquitos:</b>	<b>Coordenadas</b> Latitud:	Longitud:
<b>Período de recolección de los mosquitos:</b> Fecha de inicio: Fecha de finalización:	<b>Método de recolección:</b>	
<b>Insecticida evaluado y concentración:</b>	<b>Fecha de recubrimiento de las botellas (dd/mm/aa):</b>	<b>Número de veces que se han utilizado anteriormente las botellas recubiertas y las de control:</b>
	<b>Temperatura de conservación de las botellas</b> Máx.: Mín.:	
<b>Especie de mosquitos:</b>	<b>Cepa de mosquitos:</b>	
<b>Edad de las hembras (días):</b>	<b>Estado de alimentación:</b> (sin alimentar; alimentados con azúcar y hambrientos; otro [especificar])	
<b>Hora de inicio de la exposición:</b>	<b>Hora de finalización de la exposición:</b>	
<b>Temperatura durante la exposición y el período de retención (°C):</b> Máx.: Mín.:	<b>Humedad relativa durante la exposición y el período de retención (%):</b> Máx.: Mín.:	

## Mortalidad por botella durante el período de retención de 72 horas tras la exposición al piriproxifeno

Grupo de prueba	Botellas	Concentración del insecticida	N.º de mosquitos caídos tras 1 h de exposición	24 h (día 1)		48 h (día 2)		72 h (día 3)	
				N.º de muertos 24 h después de la exposición	Mortalidad 24 h después de la exposición (%)	N.º de muertos 48 h después de la exposición	Mortalidad 48 h después de la exposición (%)	N.º de muertos 72 h después de la exposición	Mortalidad 72 h después de la exposición (%)
Mosquitos silvestres expuestos a la CD (100 µg de PA/botella)	Botella sil1								
	Botella sil2								
	Botella sil3								
	Botella sil4								
Mosquitos silvestres de control (expuestos solo a la acetona)	Botella control sil1								
	Botella control sil2								
	Botella control sil3								
	Botella control sil4								
Mosquitos susceptibles expuestos a la CD (100 µg de PA/botella)	Botella sus1								
	Botella sus2								
	Botella sus3								
	Botella sus4								
Mosquitos susceptibles de control (expuestos solo a la acetona)	Botella control sus1								
	Botella control sus2								
	Botella control sus3								
	Botella control sus4								

### Porcentaje total de caídos y de mortalidad durante el período de retención de 72 horas tras la exposición al piriproxifeno (todas las botellas)

Grupo de prueba	Caídos (%)	Mortalidad (%)		
	Tras 1 h de exposición	24 h (día 1)	48 h (día 2)	72 h (día 3)
Mosquitos silvestres expuestos a la CD (100 µg de PA/botella)				
Mosquitos silvestres de control (expuestos solo a la acetona)				
Mosquitos susceptibles expuestos a la CD (100 µg de PA/botella)				
Mosquitos susceptibles de control (expuestos solo a la acetona)				

### Mortalidad y tasa de oviposición durante el período de oviposición de cuatro días tras el período de retención de 72 horas

Grupo de prueba		120 h (día 4)	144 h (día 5)	168 h (día 6)	192 h (día 7)
Mosquitos silvestres expuestos a la CD (100 µg de PA/botella)	N.º total introducidos en cámaras el día 4				
	N.º de muertos				
	Mortalidad (%)				
	N.º de huevos puestos				
	Tasa de oviposición (%)				
Mosquitos silvestres de control (expuestos solo a la acetona)	N.º total introducidos en cámaras el día 4				
	N.º de muertos				
	Mortalidad (%)				
	N.º de huevos puestos				
	Tasa de oviposición (%)				
Mosquitos susceptibles expuestos a la CD (100 µg de PA/botella)	N.º total introducidos en cámaras el día 4				
	N.º de muertos				
	Mortalidad (%)				
	N.º de huevos puestos				
	Tasa de oviposición (%)				
Mosquitos susceptibles de control (expuestos solo a la acetona)	N.º total introducidos en cámaras el día 4				
	N.º de muertos				
	Mortalidad (%)				
	N.º de huevos puestos				
	Tasa de oviposición (%)				



## Resultados finales de la prueba

Grupo de prueba	Inhibición de la oviposición (%)
Mosquitos silvestres de control (expuestos solo a la acetona)	
Mosquitos susceptibles expuestos a la CD (100 µg de PA/botella)	

Los mosquitos de la prueba son ..... (susceptibles/resistentes) al piriproxyfen.

Observaciones (si las hubiera):

.....  
.....  
.....

Verificado por el (la) director(a) del estudio: ..... Fecha: .....

---

*Nota:* CD: concentración discriminante. PA: principio activo. sil: silvestre. sus: susceptible.

*Fuente:* Organización Mundial de la Salud. Standard operating procedure for evaluating the sterilizing properties of pyriproxyfen in adult female mosquitoes in WHO bottle bioassays. SOP version: PPXN-Bioassay/01/14 January 2022. Ginebra: OMS; 2022. Disponible en <https://www.who.int/publications/i/item/9789240043794>.

# Anexo 9.

## Formulario para el registro de datos del ensayo biológico de la botella de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades

<b>Fecha (dd/mm/aaaa):</b>	<b>Especie de mosquitos:</b>
<b>Insecticida:</b>	
<b>Dosis diagnóstica:</b>	<b>Tiempo de diagnóstico:</b>
<b>Lugar de recolección de mosquitos:</b>	

Tiempos (min)	Botella 1		Botella 2		Botella 3		Botella 4		Todas las botellas de la prueba				Control	
	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos
0														
15														
30														
35														
40														
45														
60														
75														
90														
105														
120														
<b>Total en botella</b>														

Fuente: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Instrucciones para la evaluación de la resistencia a insecticida en vectores mediante el ensayo biológico de la botella de los CDC. Atlanta: CDC; 2012.





La Organización Panamericana de la Salud (OPS) pone a disposición del personal de salud responsable de la vigilancia y el manejo de la resistencia a los pesticidas esta publicación, como parte de las actividades para el fortalecimiento de los Estados Miembros en el ámbito de la entomología aplicada a la salud pública y el control de vectores.

El objetivo del Programa Regional de Entomología en Salud Pública y Control de Vectores, a través de la Red Regional de la OPS para la vigilancia y el manejo de la resistencia a los insecticidas, es mejorar el acceso a información que amplíe no solo el conocimiento y las habilidades del personal de salud, sino que también asegure la calidad de la aplicación de metodologías para la evaluación de la susceptibilidad a los insecticidas en vectores, con vistas al desarrollo de información fehaciente sobre la situación y detección temprana de la resistencia a los pesticidas.

En esta publicación se exponen en detalle los elementos y materiales necesarios para llevar a cabo las pruebas de susceptibilidad a insecticidas, con el fin de permitir que el personal al cargo de su realización cuente con información para planificar y estructurar sus equipos e instalaciones acorde con la normativa y los protocolos vigentes y actualizados. Por último, la presentación paso a paso de los procedimientos intenta brindar al personal de salud una herramienta de consulta rápida que permita el acceso a aspectos específicos de las metodologías descritas.

[www.paho.org](http://www.paho.org)

**OPS**



Organización  
Panamericana  
de la Salud



Organización  
Mundial de la Salud  
OFICINA REGIONAL PARA LAS  
Américas

