



Mundo
Sano

Protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas de mosquitos de la especie *Aedes aegypti*



Documento propuesto por
la Red Latinoamericana
de Control de Vectores

Ciudad de Iguazú, 23 de octubre de 2005



Mundo
Sano

Protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas de mosquitos de la especie *Aedes aegypti*



Documento propuesto por
la Red Latinoamericana
de Control de Vectores



Bisset, Juan
Blanco, Sonia
Braga, Ima
Coto, Héctor
Massuh, Héctor

Moncayo, Álvaro
Nathan, Michael
Orellano, Pablo
Vázquez Cangas, Juan
Zerba, Eduardo

Secretaría: Valeria Sfara

Prologo

Este documento es el borrador final de un protocolo para la determinación de susceptibilidad o resistencia a insecticidas discutido en un Taller de expertos de Colombia, Cuba, Brasil, Argentina y de la Organización Mundial de la Salud realizado en la Ciudad de Iguazú el 23 de Octubre de 2004. Este Taller fue convocado por la RELCOV (Red Latinoamericana en Control de Vectores) y su objetivo fue definir un protocolo que aúne criterios para la evaluación de la susceptibilidad y resistencia a insecticidas en Aedes aegypti en América Latina. Como consecuencia de dicha reunión se elaboró el Protocolo que aquí se presenta basado en las metodologías existentes para la evaluación de efectividad de insecticidas en larvas y adultos de Aedes aegypti establecidas por OMS y/o en uso en Argentina, Brasil y Cuba.

La difusión de este Protocolo sujeto a discusión se realiza para que quienes estén realizando actividades de medición de susceptibilidad y/o resistencia a insecticidas en Aedes aegypti propongan correcciones, cambios o ampliaciones en sus contenidos.

A.- INTRODUCCIÓN

Las pruebas biológicas de susceptibilidad tienen como objetivo detectar tempranamente la presencia de individuos resistentes en una población de insectos para permitir el manejo del problema a través de métodos alternativos de control.

De acuerdo a la definición de la Organización Mundial de la Salud, se entiende como resistencia, la capacidad adquirida por una población de insectos para tolerar dosis de un insecticida que serían letales para la mayoría de los individuos de una población normal de la misma especie.

Frecuentemente, los primeros indicios de resistencia surgen a partir de un fracaso de las operaciones de control. No obstante hay que tener en cuenta que esta evidencia puede inducir a errores debido a que los fracasos de las medidas de control pueden tener varias razones, tales como el uso de plaguicidas o sus formulados inadecuados para el problema, una aplicación mal realizada, condiciones climáticas desfavorables, etc..

La detección de resistencia a insecticidas en cualquier insecto puede ser realizada a través de ensayos biológicos. La metodología más establecida consiste en exponer individuos de una determinada especie de insectos provenientes de una población presuntamente resistente, al insecticida posible causa de la resistencia. Para tal fin se usa un método estandarizado, que permite la comparación de los resultados en la población presuntamente resistente con una cepa estándar que presenta un grado de susceptibilidad normal. Esta cepa susceptible debe provenir preferentemente de un laboratorio de referencia, donde es criada en condiciones estandarizadas.

Convocada por la RELCOV (Red Latinoamericana de Control de Vectores) se realizó en

Octubre del 2004 una reunión con presencia de expertos de Colombia, Cuba, Brasil, Argentina y de la Organización Mundial de la Salud para definir un protocolo que aúne criterios para la evaluación de la susceptibilidad y resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* en América Latina. Como consecuencia de dicha reunión se estableció este Protocolo basado en las metodologías existentes para la evaluación de efectividad de insecticidas en larvas y adultos de *A. aegypti* establecidas por OMS y/o en uso en Argentina, Brasil y Cuba.

B.- METODOLOGÍA

1 - Recolección de huevos mediante ovitrampas

Cada municipio o zona político-geográfica equivalente deberá ser dividido en manzanas, con instalación de ovitrampas, de modo aleatorio, para incluir regiones con diferentes niveles de infestación.

El número de ovitrampas, deberá ser definido en función de la capacidad operacional para la colecta, del tamaño del área y del número de viviendas en cada área (una medida indirecta de la densidad demográfica): ≤60.000 viviendas, 100 ovitrampas; 60.000-120.000 viviendas, 150 ovitrampas; 120.000-500.000 viviendas, 200 ovitrampas; >500.000 viviendas, 300 ovitrampas. El muestreo se realiza con la estratificación pertinente en cada caso, relacionada con el objetivo del ensayo a realizar.

Material para las ovitrampas:

Recipiente de plástico de un litro de capacidad de color negro o en su defecto pintarlo de negro o forrarlo de plástico negro.

Paletas de madera rugosa o bajalenguas.

Clip de mariposa del número 2.

Etiqueta de marcaje adhesiva de 4 por 4cm.

1/3 de litro de agua potable.
Papel bond blanco.
Bolsas de plástico.
Pluma de tinta indeleble.

Construcción de las ovitrampas:

Se colocan las paletas en la pared del recipiente y se sujeta con el clip; se adhiere una etiqueta en la pared exterior del recipiente con los siguientes datos: nombre de la localidad, número de ovitrampa, número de vivienda, si fue colocada en interior o exterior y fecha; luego se agrega agua hasta llenar un tercio del recipiente.

Colocación y ubicación

Se colocan dos ovitrampas por vivienda, una en el interior y otra en el exterior tomando en cuenta que éstas deben estar a ras del suelo y alejadas de otros posibles criaderos que representen competencia a la ovitrampa (llantas, pilas, tambos, etc.), en lugares sombreados y oscuros y fuera del alcance de los niños y animales domésticos.

Interior: En recámara, sala, comedor o lugares donde descansa la familia.

Exterior: Patio lateral, trasero, delantero, jardín, azoteas, etc..

Se recomienda que las ovitrampas sean instaladas en todos los puntos del municipio dentro de la misma semana.

Una vez colocada la ovitrampa se registrarán los datos correspondientes en la “Ficha de registro de ovitrampas”.

Revisión

Las ovitrampas se revisan cada cinco o seis días, tiempo suficiente para la oviposición de hembras grávidas. En cada revisión se lava el recipiente, se cambia el agua y las paletas.

Cada paleta retirada se envuelve en papel bond de color blanco (con el fin de que no se revuelvan las paletas y se desprendan los huevos),

en el cual se anotará el número de ovitrampa y se colocará en una bolsa de plástico. Posteriormente se transporta al laboratorio para identificar y cuantificar huevos de *Aedes aegypti*.

Si las ovitrampas o paletas no se encuentran en los lugares donde se colocaron originalmente, si están volteados o sin agua, deberán ponerse en algún otro lugar de la vivienda y reiniciar los registros.

Las ovitrampas deberán ser mantenidas en cada punto por un período de 1 a 3 semanas, hasta conseguir un 40% de ovitrampas positivas con huevos viables. Entretanto, en caso de ocurrir problemas con la eclosión de los huevos en el laboratorio de referencia, éste informará la necesidad de nueva colecta.

Obtención final de datos

Con las paletas recolectadas se completará la “Ficha de registro de ovitrampas” según la información que ésta requiera (ver anexo 1, “Ficha de registro de ovitrampas”).

Destino de las muestras

Los huevos recolectados se dejan secar y se envían al laboratorio de referencia con capacidad para monitoreo de resistencia, conjuntamente con una copia de la “Ficha de registro de ovitrampas”.

2 - Insectos

Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)

- Cepa susceptible Rockefeller o similar validada en su equivalencia de respuesta a insecticidas y mantenida en el laboratorio, a 25-30°C, 60% de humedad relativa ambiente y fotoperíodo 12:12 hs.

- Insectos salvajes recolectados como huevos (*punto 1*) en distintas zonas y enviados al correspondiente laboratorio de referencia para su evaluación.

3) Cría en Laboratorio

Las paletas de las ovitrampas que resultaron positivas se sumergen en recipientes con agua de clorada para inducir la eclosión. Las larvas emergidas se transfieren a bandejas esmaltadas o plásticas conteniendo agua corriente de clorada, donde se crían hasta el estadio de pupas. Las pupas se separan y se colocan en jaulas donde al llegar al estadio adulto se clasifican y se descartan todas las especies que no sean *A. aegypti*.

Utilizando la misma metodología se cría una cepa susceptible de *Aedes aegypti* (cepa Rockefeller o equivalente en susceptibilidad a insecticidas validada) a partir de huevos obtenidos de laboratorios de referencia que la mantengan en cría.

De los adultos emergidos se recolectan los huevos sobre un disco de algodón húmedo. Se secan y se almacenan a temperatura ambiente al menos 30 días. Para rehidratar los huevos se colocan los algodones o las paletas con aproximadamente 500 huevos en 2 lt de agua de clorada a 25 - 30°C con fotoperíodo 12:12 horas. A las 24 hs se observan larvas del primer estadio. Se alimentan todas las larvas con una mezcla de alimento balanceado para conejos molido y levadura virgen de cerveza en polvo (4:1). Se mantienen en las mismas condiciones hasta la aparición de pupas. Estas son transferidas a un pequeño recipiente con agua y colocadas en una jaula hasta la aparición de adultos.

Los adultos son mantenidos en idénticas condiciones ambientales, alimentados con pasas de uva y agua en forma permanente, pero ofreciendo una paloma inmovilizada como fuente de sangre no menos de dos veces por semana para recolectar nuevamente huevos sobre un algodón humedecido.

4 - Ensayos de susceptibilidad al larvicida temefós

4 a) Material biológico

Para los ensayos con productos larvicidas se colectan larvas de 4 mm correspondientes a estadio III tardío o IV temprano, aproximadamente cuatro días después de la eclosión.

4 b) Insecticida

Para los ensayos biológicos con larvas se utiliza Temefós (O,O,O´O´-tetrametil - O,O´-tiodi p-fenilen difosforotionato), también comúnmente conocido como "ABATE", grado técnico 98%. Este larvicida es el que mayor uso ha tenido en las Américas y para el cual ya se han establecido casos de resistencia en *Aedes aegypti*.

4 c) Efecto larvicida por Concentración Discriminante

Concentración Letal 50 % (CL_{50}) es la concentración de insecticida que mata al 50% de una población de insectos expuesta a un tóxico. Concentración Letal 99 % (CL_{99}) es la concentración de insecticida que mata al 99 % de una población de insectos expuesta a un tóxico. Se trata de parámetros estadísticos indicadores de efecto tóxico que se obtienen por interpolación en una función concentración versus mortalidad con un software "ad hoc" basado en método probit.

Con el fin de establecer una concentración que se espera mate todos los individuos susceptibles, el Comité de Especialistas de OMS, en 1975, adoptó como criterio utilizar la CL_{99} determinada sobre una población susceptible de la especie de insectos en evaluación. Esta concentración se denomina discriminante.

4 d) Aplicación de la concentración discriminante sobre larvas

Se preparan 12 recipientes o vasos descartables con capacidad para 50 ml, con 25 ml de agua destilada o agua corriente de clorada en cada uno, colocando 20 o 25 larvas en III o IV estadio.



25 ml de agua destilada o corriente declorada



Control (sin temefós)



Temefós
Concentración final:
0.012 mg/l



CONTROL

TRATADOS

- Colocar 20 o 25 larvas

Inmediatamente se preparan 12 (doce) recipientes con capacidad de 400/500 ml, colocando en los mismos 224 ml de agua destilada o agua corriente declorada. La forma del recipiente debe permitir que el agua alcance una altura no menor a 2,5 cm

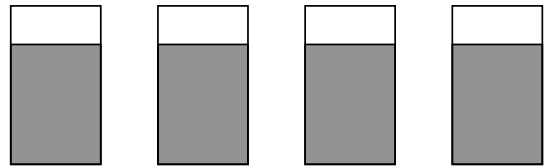


224 ml de agua destilada o corriente declorada

Recipiente de 400/500 ml

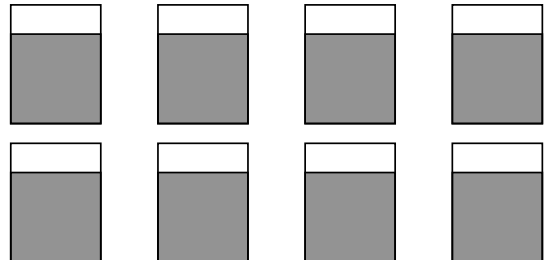
Con una pipeta se introduce, por debajo de la superficie del agua, 1 ml de alcohol (etanol) en los recipientes control y 1 ml de solución alcohólica de temefós 3 mg/ml, en los recipientes tratados, la cual da una concentración final de 0,012 mg/ml correspondiente a la concentración discriminante en los recipientes tratados. Finalizada la introducción del alcohol y el alcohol + temefós se agita el contenido de los recipientes con varilla durante 30 segundos.

CONTROL



+ 1 ml de etanol

TRATADOS

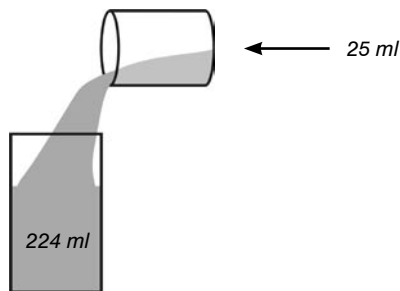


+ 1 ml de temefós 3 mg/ml (3gr/l). Cantidad necesaria para concentración final de 0.012 mg/ml.

Los recipientes deben tener las anotaciones de control y tratado respectivamente, teniendo los expuestos el nombre del producto en evaluación (en este caso Temefós), su concentración y numeración secuencial (Ej. 1,2,3...).

Para una prueba completa, se deben separar 4 recipientes para control y 8 para expuestos. La concentración de temefós internacionalmente reconocida como discriminante es de 0,012 mg/ml.

Después de un período de reposo de 15 a 30 minutos de preparadas las soluciones para el ensayo, transferir las larvas de mosquitos que están en los 12 recipientes pequeños juntamente con los 25 ml de agua, siendo 4 recipientes para control y los 8 recipientes para tratados.



$224 \text{ ml} + 25 \text{ ml} = 249 \text{ ml de agua destilada ó corriente de clorada.}$

| |
|---|
| $249 \text{ ml} + 1 \text{ ml de insecticida} = 250 \text{ ml}$ |
|---|

Se mantienen en cámara climatizada a $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y fotoperíodo 12:12 horas. Después de 24 horas de exposición, se realiza el conteo de larvas muertas y moribundas (no pueden nadar normalmente) en todos los recipientes. Las larvas moribundas se contabilizan como muertas.

Se registra también el número de larvas que hayan empupado durante el ensayo. Si en los controles mas del 10% de las larvas empupan o se registra mas del 20% de mortalidad, la prueba es considerada inválida.

Si el ensayo es aceptable, para realizar los cálculos de porcentaje de mortalidad se debe descontar el número de pupas encontradas en los expuestos y controles.

Ej.:

| | | |
|----------------------------|---|----------------|
| Nº de larvas expuestas | = | 100 |
| Nº de larvas muertas | = | 91 |
| Nº de pupas | = | 6 |
| Nº de larvas para cálculos | = | $100 - 6 = 94$ |

Cálculo del porcentaje

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de larvas muertas}}{\text{N}^\circ \text{ de larvas expuestas (corregida por pupas)}} \times 100$$

$$91 \times 100 / 94 = 96,80 \% \text{ de mortalidad observada}$$

Si la mortalidad de los controles está entre 5% y 20% tenemos que corregir por la **Fórmula de Abbott** el % de mortalidad de larvas tratadas:

$$\frac{\% \text{ de mortalidad de tratados} - \% \text{ de mortalidad de}}{100 - \% \text{ de mortalidad de controles}} \times 100$$

4e) Criterio para establecer resistencia al temefós por concentración discriminante

Si al concluir la evaluación del efecto larvicida, en al menos 5 de las 8 réplicas de tratamiento con concentración discriminante de temefós se determina una mortalidad corregida de larvas igual o mayor al 5 % se considerará que la población de mosquitos en estudio ya ha desarrollado algún grado de resistencia al larvicida.

4f) Determinación de (CL₅₀) de larvicida

Cuando el ensayo de Concentración discriminante antes descrito indica que la población de mosquitos en evaluación ha desarrollado algún grado de resistencia es recomendable determinar la Concentración Letal 50 % del Temefós (producto técnico) sobre larvas de la población de mosquitos evaluada y sobre larvas de la cepa susceptible de referencia, a los fines de establecer el factor de resistencia (ver 4g).

Para tal fin se usa una técnica similar a la descrita para aplicación de concentración discriminante, pero en cambio de usar una sola concentración de temefós como tratamiento se utilizan 5 concentraciones diferentes de temefós.

Se deben realizar, al menos, 5 réplicas de cada concentración del temefós y es necesario utilizar como mínimo 5 concentraciones distintas. La preparación de las concentraciones de temefós deben ser tales que al menos 4 de ellas causen una mortalidad entre un 2% y un 98%.

Como referencia y para la cepa susceptible de mosquitos, las soluciones de temefós técnico en etanol absoluto deben realizarse por dilución de la concentración discriminante de 3 mg/ml (concentración final 0,012 mg/ml). En el caso de la población de mosquitos cuyas larvas se consideran resistentes al temefós por ensayo de concentración discriminante, se deben incluir las concentraciones de temefós iguales o mayores que 3 mg/ml.

• Para realizar las diluciones se utiliza la fórmula:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

donde

- C_1 = Concentración inicial
- V_1 = Volumen inicial
- C_2 = Concentración final
- V_2 = Volumen final

EJEMPLO:

Tenemos un frasco conteniendo 50 ml de solución de temefós en concentración de 31,25 mg/l y se desea preparar 100 ml de solución de concentración de 3 mg/l.

Usando la fórmula:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

En donde :

- $C_1 = 31,25 \text{ mg/l}$
- $V_1 = ?$
- $C_2 = 3 \text{ mg/l}$
- $V_2 = 100 \text{ ml}$

Resulta

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$31,25 \text{ mg/l} \cdot V_1 = 3 \text{ mg/l} \cdot 100 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{3 \cdot 100}{31,25} \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{300}{31,25} \text{ ml}$$

$$V_1 = 9,6 \text{ ml}$$

Cálculo de la cantidad de solvente

$$\text{Solvente a agregar} = V_2 - V_1$$

$$\text{Solvente} = 100 \text{ ml} - 9,6 \text{ ml}$$

$$\text{Solvente} = 90,4 \text{ ml}$$

En síntesis, se debe retirar 9,6 ml de la solución de 31,35 mg/l y colocar en 90,4 ml de solvente para formar 100 ml de una solución final cuya concentración es de 3 mg/l.

Los conteos de mortalidad de larvas controles y tratadas, como asimismo las correcciones por empupamiento y mortalidad de controles se realizan en un todo de acuerdo con lo descrito en 5a (aplicación de concentración discriminante en larvas).

Los resultados que se obtengan de mortalidad de larvas en función de la concentración de temefós se analizan mediante software EPA Probit Análisis, Microprobit 3.0 o programas similares. La aplicación de un programa de este tipo da como resultado el correspondiente valor de (CL_{50}) .

4g) Determinación de Grado de Resistencia (GR) al larvicida

La metodología para obtener la Concentración letal 50 % de temefós se aplica para obtener dicho parámetro en larvas de la cepa susceptible de referencia (CL_{50S}) y en larvas provenientes de la población en la que la aplicación de concentración discriminante de

temefós indica que hay resistencia ($CL_{50}R$). El grado de resistencia (GR) es cuantas veces mas concentración de temefós se necesita para matar el 50 % de la población de larvas resistentes respecto a la que se requiere para matar el 50 % de la población de larvas susceptibles. El GR se obtiene de la siguiente ecuación:

$$GR = CL_{50}R / CL_{50}S$$

5 - EFECTO ADULTICIDA:

5a) Material biológico

Para los ensayos biológicos con compuestos adulticidas se seleccionan adultos hembras de 1-3 días de edad y sin ninguna ingesta de sangre pertenecientes a la cepa susceptible Rockefeller o la F1 (primera generación) de la población recogida en campo.

5c) Insecticidas

El ensayo biológico con mosquitos adultos se realiza con el insecticida que esté siendo usado mas intensamente en la región para tratamientos espaciales.

Se prepara una solución de permetrina Cis: Trans 95:5 en acetona tal que la concentración final del film sobre una superficie de 300 cm^2 sea 0,05 μg i.a./ cm^2 .

5d) Método de la botella impregnada (basado en el método del CDC)

El Dr. William Brogdon del Centro de Control de Enfermedades – CDC/ Atlanta desarrolló un método simplificado para la determinación de resistencia a insecticidas utilizando botellas de vidrio impregnadas con insecticidas sobre el que se basa el método aquí descrito. Esta metodología se puede consultar en: www.pherec.org/bottleassay/procedure.htm

Se utilizan frascos de vidrio (Wheaton) de boca angosta (3 cm de diámetro), de 250 ml de capacidad. Se utiliza el insecticida en estudio grado técnico disuelto en acetona; las soluciones se preparan de forma tal que la concentración final del film corresponda a la menor concentración que voltea el 100% de los mosquitos en un período de tiempo entre 30 y 60 minutos. Para cada país o región dentro de las Américas se realizará este ensayo con el insecticida de mayor uso, para el cual será necesario establecer la concentración adecuada que voltee el 100 % de los mosquitos en un lapso de entre 30 y 60 minutos. En la tabla siguiente se indican las concentraciones de diferentes insecticidas recomendadas en bibliografía para impregnar la botella.

| INGREDIENTE ACTIVO | CONCENTRACION/BOTELLA |
|--|-----------------------|
| Malathion | 474 μg /botella |
| Fention | 800 μg /botella |
| Naled | 25 μg /botella |
| Permetrina | 43 μg /botella |
| Permetrina (cis-trans 95:5) | 15 μg /botella |
| Resmethrin | 30 μg /botella |
| d-Phenothrin | 22 μg /botella |
| Ciano-piretroide (deltametrina y cipermetrina) | 25 μg /botella |

Para la impregnación se coloca con una pipeta 1,0 ml de una solución acetónica del insecticida con la concentración correspondiente de dicho insecticida indicada en la tabla anterior. Se rota la botella para mojar toda la superficie e impregnar interiormente base, paredes y tapa. Para realizar la impregnación, colocar la solución en el frasco, girarlo para mojar uniformemente la base, invertir la botella para mojar la tapa, colocarla de costado y rotarla ligeramente para cubrir las paredes durante 1-2 min. Asegurarse que las botellas estén secas antes de impregnar. Es conveniente secarlas previamente en estufa a 100° durante 15-20 minutos.

Se deja evaporar el solvente 24 horas a temperatura ambiente con la botella destapada y luego se termostatiza durante 60 minutos a 26 - 28°C. Si se desea volver a usar las botellas para un segundo ensayo con una nueva tanda de mosquitos, esperar 2 hs entre un ensayo y otro, antes de introducir nuevos mosquitos.

Para los controles se impregna la botella con 1,0 ml de acetona y se procede en la misma forma que la impregnación con las soluciones de insecticida.

Se introducen de 15 a 25 mosquitos adultos hembras de 1-3 días de edad, alimentadas sin ingesta de sangre, que previamente se habían colectado en un tubo o en un aspirador bucal y se transfieren a los frascos mediante un suave soplo de aire. Se tapa el frasco y se examinan los frascos para asegurar que los mosquitos transferidos estén en perfecto estado de supervivencia.

Comenzar el conteo con un cronómetro y registrar los mosquitos volteados o muertos a intervalos fijos de tiempo hasta obtener un volteo mayor que 90% o 1 hora. Para el registro de insectos volteados los intervalos de tiempo deben permitir al menos 5 lecturas. En los primeros ensayos es conveniente tener una buena cantidad de lecturas de volteo para lo cual es ventajoso tomarlas cada minuto.

Al finalizar el ensayo se realiza el conteo exacto de los mosquitos introducidos en cada una de las botellas. En caso de haber sobrevivientes se deberá esperar a que todos los mosquitos estén muertos. Para acelerar este proceso se puede colocar la botella en un freezer.

Se calcula el % de insectos volteados (en el piso, sin volar y afectados) a cada tiempo. Con estos valores se obtiene el parámetro tiempo de volteo 50 % (TV_{50}), que es el tiempo necesario para observar un 50 % de volteo en la población de mosquitos expuesta al insecticida. El parámetro TV_{50} se calcula utilizando los softwares indicados para obtener CL_{50} en larvas.

Como todos los bioensayos de resistencia, los datos obtenidos con el método de las botellas impregnadas necesitan una comparación entre mosquitos susceptibles provenientes de la cepa susceptible Rockefeller y los provenientes de la población presuntamente resistente.

Un límite de resistencia para cada insecticida es determinado estableciendo el tiempo mínimo para el cual todos los mosquitos de la colonia susceptible mueren. Si hay mosquitos sobrevivientes por encima de este tiempo límite, se interpreta que estos sobrevivientes son un indicador de la proporción de la población que tiene resistencia. Ej. todos los mosquitos de la colonia de referencia susceptible mueren antes de 75 minutos cuando son expuestos a fention con 800 μ g/botella. Cualquier mosquito que en un bioensayo de una población recogida en campo sobreviva por encima de los 75 minutos se considera que tiene algún grado de resistencia.

5d) Método del papel impregnado de la Organización Mundial de la Salud (WHO/ VBC/81.806).

Composición del Kit

(Supplies for monitoring insecticide resistance in disease vectors WHO/CDS/CPE/PVC/2001.2)

1) tubos plásticos de 125mm de altura y de 44 mm de diámetro interno:

- a) Tubos para exposición de mosquitos al insecticida (con marca roja);
- b) Tubos de reposo (con marca verde):
 - 2 para control.
 - 5 para ensayo previo y observación posterior a la exposición.

2) 6 soportes para los tubos plásticos con orificio de 20 mm.

3) 12 clips

4) pinza

5) 2 capturadores de succión

6) papel blanco (12 x 15 cm) para forrar el interior del tubo de espera

7) papel blanco (12 x 15 cm) impregnado con apenas del solvente utilizado para las sustancias a ser testeadas

8) papel impregnado con insecticida

9) formularios

Procedimiento

1) Insertar en cada tubo de observación (marca verde) un papel blanco limpio, enrollado en forma cilíndrica para cubrir la pared interna del tubo y con un clip sujetar el papel.



2) Colocar los tubos en las unidades de soporte.

3) Colocar 15 a 25 hembras de la población a ser testeada, previamente alimentadas con sangre, en cada tubo.

4) Esperar 1 hora, y observar si hay mosquitos muertos o dañados, que deban ser substituídos.

5) Recubrir los tubos de exposición (marca roja) con el papel impregnado con el insecticida que se desea testear y sujetar con clip.

6) Colocar dentro del tubo control una hoja de papel impregnado con solvente y sujetar con el clip.

7) Acoplar los tubos con marca verde (reposo) y los con marca roja (exposición) a través del soporte para los tubos plásticos abriendo totalmente la guillotina entre ellos para proceder al pasaje de adultos.

8) Con leves soplos, los mosquitos son transferidos hacia el tubo que contiene el insecticida al cual deberán ser expuestos.

Dejar los mosquitos en los tubos de exposición/control durante un período de ex-

posición de una hora en condiciones de iluminación difusa, humedad entre 80% y 90% y temperatura adecuada (entre 20 y 30 °C). Los papeles con insecticida y papeles controles pueden ser adquiridos en la OMS (Supplies for monitoring insecticide resistance in disease vectors WHO/CDS/CPE/PVC/2001.2).

9) La concentración y el tiempo de exposición pueden variar en casos particulares informados en la bibliografía.

10) Para cada concentración y tiempo de exposición el ensayo deberá ser repetido en 4 réplicas y contar con un igual número de controles.

11) Después del tiempo de exposición, los mosquitos son nuevamente transferidos, en la misma forma, soplando en sentido inverso hacia el tubo inicial (observación).

12) Desconectar el tubo de insecticida.

13) Los mosquitos dejados en observación por 24 horas en ambiente a temperatura entre 20 °C y 30 °C y a humedad relativa entre 80% y 90%.

14) Se coloca sobre el tubo en observación, un trozo de algodón humedecido con agua azucarada.

15) Al final del período de observación se cuentan los mosquitos muertos, considerando como tales todos aquellos incapaces de volar.

16) Registrar los datos en un formulario.

Los criterios de interpretación de OMS son:

a) 98 - 100% mortalidad → Susceptible (SS)

b) 80 - 98% mortalidad → Verificación requerida (VR) *)

c) < 80% mortalidad → Resistente

*) *repetición del ensayo.*



Mundo
Sano

www.mundosano.org



www.relcov.org