



# Procedimientos de las pruebas para la vigilancia de la resistencia a los insecticidas en los mosquitos vectores del paludismo

Segunda edición



# **Procedimientos de las pruebas para la vigilancia de la resistencia a los insecticidas en los mosquitos vectores del paludismo**

Segunda edición



# Índice

<b>Agradecimientos</b>	<b>1</b>
<b>Abreviaciones</b>	<b>2</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>3</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>6</b>
<b>2. Evolución de la prueba OMS de susceptibilidad a los insecticidas y antecedentes de la actual revisión</b>	<b>10</b>
<b>3. Prueba OMS de susceptibilidad para mosquitos adultos</b>	<b>12</b>
<b>3.1</b> Pruebas de susceptibilidad a la concentración discriminante	12
<b>3.2</b> Pruebas de susceptibilidad para determinar la intensidad de la resistencia	13
<b>3.3</b> Protocolos de muestreo	20
3.3.1 Selección de los ejemplares de prueba	20
3.3.2 Distribución espacial y frecuencia de las pruebas de susceptibilidad	22
3.3.3 Tamaño muestral	23
3.3.4 Determinación de especies	24
3.4.1 Número de mosquitos sometidos a prueba	25
3.4.2 Condiciones ambientales	25
3.4.3 Número de usos de los papeles impregnados	26
<b>3.5</b> Mortalidad y ajustes a los cálculos	26
<b>3.6</b> Interpretación de los resultados	27
3.6.1 Pruebas de susceptibilidad a la concentración discriminante	27
3.6.2 Pruebas de susceptibilidad a las concentraciones 5x y 10x	27
<b>3.7</b> Material y suministros	28
3.7.1 Procurement	28
3.7.2 Composición del kit de prueba de la OMS	29
3.7.3 Papeles impregnados de insecticida y sinergista	29

<b>4. Análisis complementarios: prueba con sinergista e insecticida para inferir mecanismos de resistencia metabólica</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b> Uso de sinergistas en las pruebas de susceptibilidad a los insecticidas	31
<b>4.2</b> Registro y presentación de los resultados de la prueba con sinergista e insecticida	34
4.2.1 Medida de la mortalidad	34
4.2.2 Comparación entre las muestras expuestas a sinergista y las no expuestas	34
<b>4.3</b> Interpretación de los resultados de las pruebas con sinergista e insecticida	35
<b>4.4</b> Material y suministros	35
<b>5. Prueba de la botella de los CDC para mosquitos adultos</b>	<b>36</b>
<b>5.1</b> Prueba de la botella con tiempos de exposición y concentraciones discriminantes	36
<b>5.2</b> Prueba de la botella a concentraciones crecientes para determinar la intensidad	36
<b>5.3</b> Ventajas e inconvenientes de la prueba de la botella	37
<b>6. Análisis complementarios en laboratorio: determinación de los mecanismos de resistencia</b>	<b>39</b>
<b>7. Manejo y utilización de los datos</b>	<b>40</b>
<b>7.1</b> Manejo y reporte de datos	40
<b>7.2</b> Uso de los datos para la toma de decisiones	41
<b>8. Recomendaciones adicionales</b>	<b>42</b>
<b>Referencias</b>	<b>44</b>
<b>ANEXO 1.</b> Formulario para registrar información sobre la recolección de mosquitos y las condiciones experimentales	46
<b>ANEXO 2.</b> Formulario para registrar los resultados de pruebas de susceptibilidad a la concentración discriminante y a las concentraciones 5x y 10x	47
<b>ANEXO 3.</b> Formulario para registrar los resultados de las pruebas con sinergista (PBO al 4%) e insecticida	48
<b>ANEXO 4.</b> Concentraciones discriminantes y tiempo de exposición de los insecticidas habitualmente utilizados contra mosquitos del género <i>Aedes</i>	50

## AGRADECIMIENTOS

El Programa Mundial sobre Malaria de la Organización Mundial de la Salud desea expresar su agradecimiento a las siguientes personas por haber contribuido a definir los procedimientos de las pruebas aquí descritas: Birkinesh Ameneshewa, Bill Brogdon, Basil Brooke, Fabrice Chandre, Adanan Che Rus, Maureen Coetzee, Martin Donnelly, Josiane Etang, Christen Fornadel, Mary Anne Groepe, Pierre Guillet, Melinda Hadi, Jeffrey Hii, Zairi Jaal, Tessa Knox, Abraham Mnzava, Martha Quiñones, Hilary Ranson, Mark Rowland, Emmanuel Temu y Rajpal Yadav.



## ABREVIACIONES

CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Estados Unidos)
DDT	diclorodifeniltricloroetano
ELISA	ensayo inmunoenzimático
RRI	rociado residual intradomiciliar
<i>kdr</i>	resistencia <i>knockdown</i>
MILD	mosquitero insecticida de larga duración
PBO	butóxido de piperonilo (PBO por sus siglas en Inglés)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en Inglés)
<i>rdl</i>	resistencia al dieldrín
OMS	Organización Mundial de la Salud
WHOPES	Plan OMS de evaluación de plaguicidas

## GLOSARIO



<b>Ace-1</b>	Gen que confiere resistencia a carbamatos y organofosforados por alteración de su sitio diana, al codificar una acetilcolinesterasa insensible. La resistencia resulta de una única mutación, G119S, en el gen <i>Ace-1</i> .
<b>Combinación de insecticidas</b>	Aplicación de dos o más insecticidas cuyos mecanismos de acción no guardan relación entre sí dentro de una vivienda o edificio (p.ej. una clase de insecticida en las paredes y otra clase sobre los mosquiteros utilizados en la misma vivienda). La aplicación de combinaciones de insecticidas difiere del uso de mezclas de insecticidas en que, en el primer caso, es probable, pero no seguro, que un insecto vaya a entrar en contacto con ambos insecticidas.
<b>Concentración discriminante (o diagnóstico) de insecticida</b>	<p>Concentración de insecticida que, combinada con un tiempo de exposición predefinido, se utiliza para determinar las proporciones de fenotipos susceptibles y resistentes dentro de una muestra de una población de mosquitos. Se expresa como porcentaje de principio activo por unidad de volumen de aceite portador con el que se impregna, en una cantidad fija por unidad de superficie del papel de ensayo.</p> <p><i>Nota. La concentración discriminante combina un tiempo fijo de exposición con la cantidad de insecticida aplicado sobre el papel de ensayo, cuya absorción depende del tiempo de contacto tarsal efectivo.</i></p>
<b>Dosis discriminante (o diagnóstico) de insecticida para resistencia</b>	<p>Dosis fija de un insecticida disuelto en disolvente que se aplica tópicamente al cuerpo del mosquito. Se utiliza para determinar las proporciones de fenotipos susceptibles y resistentes dentro de una muestra de una población de mosquitos.</p> <p><i>Nota. Cuando el factor genético que confiere resistencia es dominante o recesivo, solo opera una dosis discriminante. Cuando dicho factor es semidominante, pueden operar dos dosis discriminantes: una dosis inferior que solo matará a los mosquitos susceptibles y una dosis más alta que matará tanto a los mosquitos susceptibles como a los resistentes heterocigotos (pero no a los resistentes homocigotos).</i></p>
<b>Larvicida</b>	<p>Sustancia química aplicada a los hábitats acuáticos para matar a las larvas de mosquitos.</p> <p><i>Nota. Los larvicidas se aplican en forma de aceites o de películas monocapa (para asfixiar a las larvas o pupas) o como formulaciones del tipo de comprimidos (para la aplicación directa), gránulos, concentrados emulsionables, gránulos hidrosolubles o polvos humectables.</i></p>
<b>Mezcla insecticida</b>	Producto insecticida que consta de dos o más principios activos coformulados o producto preparado como mezcla a granel de dos o más principios activos de tal forma que, tras su aplicación, el mosquito entre en contacto con todos ellos simultáneamente. Las mezclas utilizadas con fines de manejo de la resistencia suelen contener principios activos de diferentes clases.



<p><b>Mosaico de insecticidas</b></p>	<p>Método para atenuar los efectos de la resistencia que consiste en aplicar insecticidas con distintos mecanismos de acción en diferentes segmentos de la superficie tratada (generalmente dividida en una cuadrícula), de tal modo que ciertas partes de la población de mosquitos se vean probablemente expuestas a un insecticida y otras partes a otro insecticida de distinta clase.</p> <p><i>Nota. Lo ideal es combinar este método con la rotación de insecticidas, de manera que los tratamientos que forman el mosaico se vayan alternando periódicamente en los distintos segmentos.</i></p>
<p><b>Mosquitero insecticida de larga duración (MILD)</b></p>	<p>Mosquitero tratado en fábrica, hecho de un material al que el insecticida se incorpora o a cuyas fibras se fija. Un MILD debe conservar su actividad biológica eficaz durante al menos 20 lavados normales (como los define la OMS) en condiciones de laboratorio y durante 3 años de utilización sobre el terreno si se siguen las recomendaciones de uso.</p> <p><i>MILD de combinación:</i> MILD que consta de dos o más mallas diferentes, cada una de las cuales presenta distintas especificaciones en cuanto a fibras o principio(s) activo(s), o ambas cosas, con o sin sinergistas.</p> <p><i>MILD de mezcla:</i> MILD cuyo tejido está tratado íntegramente con dos o más insecticidas no emparentados entre sí y exentos de resistencia cruzada, de tal modo que el insecto que entre en contacto con él se vea expuesto a todos los insecticidas a la vez.</p>
<p><b>Población susceptible</b></p>	<p>Población que no se ha visto sometida a presión selectiva por insecticidas y no alberga, o alberga muy pocos, individuos resistentes.</p>
<p><b>Progenie F1</b></p>	<p>Aunque en general significa “primera generación filial”, aquí se utiliza para designar el uso de adultos criados a partir de huevos de hembras de mosquito capturadas en campo con el fin de obtener una muestra de edad uniforme de una población, para utilizarla en pruebas de resistencia.</p>
<p><b>Pruebas de susceptibilidad</b></p>	<p>Pruebas en las cuales se exponen muestras de insectos de una población silvestre a una concentración fija de insecticida en papel de filtro suficiente para matar sistemáticamente a los insectos susceptibles, de manera que se pueda inferir que todo superviviente es resistente. La prueba en tubos de la OMS se ha establecido desde hace tiempo, mientras que en fechas más recientes los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos han desarrollado el método de prueba utilizando botellas.</p>
<p><b>Resistencia cruzada</b></p>	<p>Resistencia a un insecticida por un mecanismo que también confiere resistencia a insecticidas de otra clase, aun cuando la población o cepa de insectos no haya sufrido presión selectiva por exposición a estos últimos.</p>



<b>Resistencia a los insecticidas</b>	<p>Capacidad de los mosquitos de sobrevivir a la exposición a una determinada dosis de insecticida, rasgo que puede ser de origen fisiológico o resultar de una conducta adaptativa.</p> <p><i>Nota. La aparición de resistencia a un insecticida en una población de vectores es un fenómeno evolutivo inducido por una conducta de evasión (p.ej. exofilia en lugar de endofilia) o por factores fisiológicos gracias a los cuales, en los mosquitos resistentes, el insecticida es metabolizado (o no potenciado, o absorbido) en menor medida que en los mosquitos susceptibles.</i></p>
<b><i>kdr</i> (mutación <i>knockdown</i>)</b>	<p>La resistencia <i>knockdown</i> obedece a una serie de genes que codifican una mutación del canal de iones de sodio, que es el sitio diana de los piretroides y los compuestos organoclorados (como el diclorodifeniltricloroetano, o DDT). Esta mutación confiere resistencia a dichos insecticidas..</p>
<b>Simpatría</b>	<p>Fenómeno que se produce cuando hay especies que ocupan un mismo territorio de forma simultánea pero no se reproducen entre sí.</p>
<b>Sinergista</b>	<p>Sustancia que por sí misma no posee propiedades insecticidas pero que, al ser mezclada y aplicada con insecticidas de una determinada clase, aumenta considerablemente su potencia porque inhibe un enzima que en condiciones normales actúa desintoxicando el organismo del insecto para librarlo del insecticida.</p>

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos 15 años, las actividades de lucha contra el paludismo (o malaria) en todo el mundo han deparado notables resultados. Según las estimaciones, en 2015 hubo 214 millones de casos de paludismo (rango: 149–303 millones) y la enfermedad causó 438 000 muertes (rango: 236 000–635 000). De 2000 a 2015, la incidencia del paludismo se redujo en un 37% a escala mundial y en un 42% en África (1). Buena parte de la reciente disminución de la carga mundial de paludismo es fruto de la generalización de intervenciones básicas para el control de los vectores, concretamente la distribución de mosquiteros insecticida de larga duración (MILD) y el rociado residual intradomiciliar (RRI) (2).

Hasta ahora la OMS ha recomendado a los programas de salud pública el uso de cuatro clases de insecticida contra los mosquitos adultos.<sup>1</sup> De esas cuatro clases, la que más se ha utilizado es la de los piretroides, aunque últimamente los programas de RRI tienden a emplearla en menor medida debido a la aparición de resistencia. Los piretroides presentan varias ventajas con respecto a las demás clases de insecticida, en particular en relación con el costo, la seguridad para el ser humano (son poco tóxicos para los mamíferos) y la duración de la acción residual. Aunque se utilizan de modo generalizado en la agricultura y como plaguicidas domésticos, su empleo como larvicida es infrecuente porque resultan muy tóxicos para otros organismos acuáticos, en particular los peces. A día de hoy los piretroides están presentes en todos los MILD recomendados por la OMS y en varios productos de RRI empleados en el mundo entero (3). De momento no hay alternativas para el tratamiento de los mosquiteros, aunque ahora existen mosquiteros tratados con sinergista+piretroide. Entre los productos que tiene actualmente en estudio el Plan OMS de evaluación de plaguicidas (WHOPES) hay MILD tratados con un piretroide y otro compuesto de una clase diferente (p.ej. clorfenapir o piriproxifen), así como productos para el RRI a base de clotianidina, formulada o no con un piretroide.

El uso prácticamente sistemático de piretroides para tratar mosquiteros y el amplio empleo de otras clases de insecticidas para el rociado de interiores, como compuestos organoclorados (p.ej. el diclorodifeniltricloroetano, o DDT) y organofosforados, han llevado a la aparición de resistencia a los insecticidas en los vectores del paludismo. Gracias a la intensificación de la vigilancia entomológica en zonas afectadas por el paludismo en los últimos años, la OMS ha podido reunir un importante volumen de datos con los que confirmar la fundada sospecha de que la aplicación generalizada de estrategias de lucha antipalúdica basadas en el uso de insecticidas ha conducido a la selección de resistencia en varias especies importantes de vectores, en particular las africanas *Anopheles gambiae*, *An. coluzzii*, *An. funestus* y *An. arabiensis*. Desde 2010 se ha descrito resistencia como mínimo a una clase de insecticida en al menos una especie de vector de paludismo en 60 de los 96 países con paludismo endémico donde se efectuaron labores de vigilancia. Además, 49 países han informado de resistencia a por lo menos dos clases de insecticidas. Está descrita resistencia a las cuatro clases de insecticidas existentes. La más frecuentemente notificada es la resistencia a los piretroides, presente en tres de cada cuatro de los países que vigilan esta clase en 2014 (4). Se han podido describir igualmente los mecanismos responsables de estos elevados niveles de resistencia, mecanismos que suelen ser de dos tipos básicos: los mediados por alteraciones del sitio diana del insecticida (p.ej. mutaciones que inducen resistencia *knockdown* [*knr*]); y los que resultan de la elevación de la tasa de degradación metabólica del insecticida. Con todo, es probable que en los fenotipos muy resistentes observados

---

1 <http://www.who.int/whopes/en>



en algunas poblaciones estén actuando otros mecanismos de resistencia por ahora desconocidos. En el recuadro 1.1 se ofrece más información sobre los mecanismos de resistencia y sus repercusiones en las estrategias de lucha antivectorial.

Los profesionales de todo el mundo que combaten el paludismo están reaccionando ante la amenaza que puede suponer la aparición de resistencia a los insecticidas. En mayo de 2012 la OMS instituyó el “Plan mundial para el manejo de la resistencia a los insecticidas en los vectores de malaria” (en adelante, el “Plan mundial”) (5), en el cual se establece un plan integral de acción que propone cinco líneas de trabajo fundamentales (o “pilares”):

- planificar e implementar estrategias nacionales de manejo de la resistencia a los insecticidas;
- asegurar la realización de vigilancia entomológica y de la susceptibilidad, así como un eficaz manejo de los datos;
- el desarrollo de nuevas e innovadoras herramientas para el control de vectores;
- llenar los vacíos de conocimiento con relación a los mecanismos de resistencia a los insecticidas y el impacto de las estrategias utilizadas para su manejo; y
- instituir mecanismos que ayuden a potenciar la abogacía y a mejorar la dotación de recursos humanos y económicos.

En el Plan mundial se afirma de modo inequívoco la necesidad de intensificar la labor de vigilancia de la resistencia a los insecticidas. En él también se propugna por una mayor regulación de estas actividades dentro de los programas nacionales de lucha antipalúdica. Es preciso, en particular, que los planes de vigilancia respondan a la creciente necesidad de disponer de datos más detallados sobre: la distribución de las especies de vectores y sus comportamientos (patrones de alimentación y reposo, por ejemplo); la resistencia presente en cada especie o población de vector a insecticidas que se utilicen actualmente o se prevea utilizar; y la calidad y eficacia de las intervenciones de control vectorial. También se considera que estudios epidemiológicos para evaluar implicaciones operacionales que puedan tener los distintos tipos de resistencia son un componente indispensable de los nuevos conocimientos que urge adquirir para orientar el uso de insecticidas y la elaboración de estrategias de manejo de la resistencia como parte de los programas de lucha contra el paludismo y otras enfermedades transmitidas por vectores (6).

La OMS viene ayudando a los países a vigilar y manejar la resistencia a los insecticidas, labor que sigue constituyendo una de las funciones básicas de su Programa Mundial sobre Malaria. La Organización lleva más de 50 años centralizando a escala mundial la información sobre la aparición de resistencia en los vectores y, a partir de ahí, facilitando a sus Estados Miembros asesoramiento y orientaciones periódicamente actualizadas sobre el seguimiento y el manejo de la resistencia a los insecticidas a medida que esta va evolucionando. Como parte de este cometido, y a fin de asegurar la comparabilidad de los datos entre diferentes países y fuentes, la OMS ha definido normas operativas y procedimientos de prueba normalizados para detectar y vigilar la resistencia a los insecticidas en diversos vectores de enfermedades, en particular los mosquitos. El suministro de kits de

pruebas de susceptibilidad de calidad garantizada para su utilización en campo también ha sido un componente básico de la labor de la OMS en la materia.<sup>2</sup>

En el caso de los vectores del paludismo, se han publicado una serie de documentos con instrucciones para detectar experimentalmente la presencia de resistencia a los insecticidas empleando una técnica normalizada de bioensayo en mosquitos adultos (7-10). Estos procedimientos se han ido actualizando para tener en cuenta la evolución de las estrategias de lucha antipalúdica, en particular la integración de nuevas clases de insecticidas, o de nuevos insecticidas de clases ya existentes, en los programas de lucha contra enfermedades transmitidas por vectores. La última versión de estos procedimientos, publicada en 2013 (9), cubre las cuatro principales clases de insecticidas que se utilizan de modo sistemático: organoclorados (como el DDT); organofosforados (como el malatión o el pirimifos metil); carbamatos (como el bendiocarb); y piretroides, además de nuevos compuestos representativos de los pirroles (como el clorfenapir) y los fenilpirazoles (como el fipronil).

Ante la evidencia que demuestra crecientes niveles de resistencia, sobre todo a los piretroides, entre los vectores del paludismo, y ante el peligro de que ello erosione los éxitos obtenidos últimamente en la lucha contra esta enfermedad, se ha prestado especial atención a la necesidad de hacer un seguimiento más intensivo y eficaz de la resistencia a los insecticidas (y en especial de las consecuencias que pueda tener desde el punto de vista operativo y epidemiológico), con el objetivo de orientar la elaboración de estrategias nacionales de manejo de la resistencia. Esta situación ha generado muchas peticiones de actualización de las directrices de 2013, principalmente para dotarlas de mayor utilidad práctica por lo que respecta a las decisiones y políticas de lucha antivectorial.

---

#### RECUADRO 1.1.

#### **MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS INSECTICIDAS Y SUS EFECTOS SOBRE LOS PROGRAMAS DE LUCHA ANTIVECTORIAL**

El manejo de la resistencia a los insecticidas se ve complicado por el hecho de que la resistencia pueden revestir diversas formas. En términos generales, los principales mecanismos de resistencia pueden ser divididos en dos grupos: *resistencia metabólica* y *resistencia por alteración del sitio diana*.

La resistencia metabólica se debe a una modificación de los sistemas enzimáticos del mosquito por la cual este se desintoxica del insecticida con más rapidez de lo normal. La desintoxicación impide que el insecticida llegue al sitio de acción al que iba dirigido dentro del organismo del mosquito. En el caso de los vectores del paludismo, se piensa que hay tres sistemas enzimáticos cuya intervención es importante para metabolizar los insecticidas: las esterasas, las monooxigenasas y las glutatión S-transferasas.

---

2 <http://www.who.int/whopes/resistance/en/> - en inglés



La resistencia por alteración del sitio diana se produce cuando una mutación modifica el receptor proteínico que el insecticida está destinado a atacar. Cuando ello ocurre, el insecticida ya no puede unirse al que era su sitio diana en el receptor, y como consecuencia el insecto no resulta afectado por el insecticida, o lo resulta en menor medida. En el caso del DDT y los piretroides, la mutación, que tiene lugar en el receptor del canal del sodio, confiere lo que se denomina “resistencia *knockdown*” (mediada por los genes *kdr*). En el caso de los organofosforados y los carbamatos, la mutación se produce en la proteína acetilcolinesterasa (un neurotransmisor) y confiere lo que suele denominarse resistencia *Ace-1*. El gen que codifica la resistencia al dieldrín (*rdl*) afecta al receptor del ácido gamma-aminobutírico y, según se ha comprobado, también confiere resistencia al fipronil.

La situación se complica aún más por la existencia de “resistencia cruzada” entre distintas clases de insecticidas que comparten un mismo mecanismo de acción. Por ello vectores que son resistentes al DDT porque poseen el gen asociado a la resistencia *kdr* también serán probablemente resistentes a ciertos insecticidas piretroides. Análogamente, la mutación *Ace-1* puede conferir resistencia tanto a carbamatos como a organofosforados por alteración de su sitio diana. También puede darse resistencia cruzada cuando una misma enzima sirve para metabolizar insecticidas de dos o más clases distintas. Además, en los países afectados por el paludismo está aumentando la prevalencia de mecanismos de multiresistencia a los insecticidas que coexisten en una sola población de mosquitos o incluso dentro de un mismo individuo. La existencia de resistencia cruzada y multiresistencia reduce los posibles insecticidas alternativos cuando se detecta resistencia.

Con todo, dista de estar claro de qué modo la magnitud de la resistencia que se viene observando influirá en la eficacia de los actuales programas de lucha antivectorial. A raíz de un estudio realizado en 2014 se observó que, aun en presencia de resistencia a los piretroides, los mosquiteros tratados con éstos insecticidas ofrecen más protección contra las picaduras por mosquitos que los no tratados y que los primeros pueden inducir una significativa mortalidad de mosquitos (11). Desde entonces, sin embargo, el nivel de resistencia a los piretroides ha aumentado dramáticamente en muchos lugares (12). En general, los escasos datos existentes indican que elevados niveles de resistencia pueden hacer inoperantes las medidas de RRI y, por ende, tener efectos epidemiológicamente importantes en la incidencia del paludismo (13). Por lo que respecta a la eficacia de los MILD, la situación es más compleja, y aún faltan datos que demuestren de modo concluyente que la resistencia a los piretroides hace inoperante esta medida de control. Aun así, no cabe descartar la posibilidad de que la selección evolutiva de una creciente intensidad de la resistencia en poblaciones silvestres de mosquitos reste eficacia a las intervenciones con piretroides. La línea de trabajo prudente pasa, en consecuencia, por adelantarse a los acontecimientos y modificar las praxis actuales con el fin de retrasar la propagación de la resistencia y preservar la eficacia de los insecticidas utilizados actualmente, al menos hasta disponer de herramientas innovadoras con nuevas clases de insecticidas. Es previsible que en el futuro, gracias al uso de pruebas de determinación de la intensidad de la resistencia, sea posible discernir las regiones o zonas donde la resistencia se exprese con la máxima intensidad y donde por lo tanto sea más probable que fracase la lucha antivectorial con insecticidas. Allí será donde se requiera una respuesta urgente.

## 2. EVOLUCIÓN DE LA PRUEBA OMS DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS INSECTICIDAS Y ANTECEDENTES DE LA ACTUAL REVISIÓN

La prueba de la OMS de la susceptibilidad a los insecticidas, principal objeto de la revisión y ampliación de estos procedimientos, es una prueba sencilla de respuesta a la exposición. Tras exponer a los mosquitos a concentraciones conocidas de un insecticida durante un determinado tiempo, se registra el número de individuos muertos una vez transcurridas al menos 24 horas desde la exposición. En su forma actual, la prueba sirve para distinguir entre el nivel de susceptibilidad de referencia y la resistencia a los insecticidas en mosquitos adultos. En este sentido, está concebida como herramienta de vigilancia en campo y en el laboratorio, aunque presenta la limitación de ofrecer poca información sobre los mecanismos que confieren resistencia (cuando la haya) o sobre la fuerza de esa resistencia.

El material y los procedimientos de prueba han cambiado relativamente poco desde que a principios de la década de 1960 la OMS empezó a recomendar el uso de una técnica estandarizada para detectar resistencia a los insecticidas (14). Las modificaciones metodológicas introducidas a lo largo de los años, han sido menores y tienen que ver principalmente con las condiciones y los controles de la prueba y con los protocolos de muestreo de insectos (7, 10, 15). Los cambios introducidos en la versión de 2013 (9) guardaban relación sobre todo con los criterios de interpretación de los datos, la adición de concentraciones discriminantes de nuevos principios activos, una breve descripción de pruebas relativas a los mecanismos de resistencia y un resumen de la prueba de la botella desarrollada por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC).<sup>3</sup>

El impulso original para elaborar la versión de 2013 (9) vino dado por las recomendaciones resultantes de una consulta convocada en mayo de 2010 por el Programa Mundial sobre Malaria y la OMS, en la cual se revisó la situación de la resistencia a los insecticidas en los vectores del paludismo con objeto de definir estrategias que retrasaran su aparición. La actual revisión, por su parte, es fruto de una consulta convocada en diciembre de 2015 con el fin de revisar y adaptar los procedimientos vigentes para hacer mayor hincapié en la obtención de datos que sean útiles desde el punto de vista operativo y sirvan, por ende, para tomar decisiones en la lucha antivectorial. En el curso de una consulta de la OMS celebrada en abril de 2016, a sabiendas de que la resistencia a los insecticidas es uno de los principales aspectos que hay que tener en cuenta para planificar y ejecutar eficazmente medidas de lucha antivectorial con insecticidas, y teniendo en cuenta el imperativo de manejar la resistencia, se formularon una serie de recomendaciones sobre el rumbo futuro de las labores de detección y vigilancia de la resistencia a los insecticidas. Además de insistir en la necesidad de aumentar de inmediato la realización de pruebas de susceptibilidad y de instituir mecanismos de reporte de datos, los participantes en la consulta recomendaron ampliar el protocolo a tres pasos:

- Paso 1. Detectar la presencia de fenotipos resistentes en una población, empleando para ello las pruebas con la concentración discriminante de acuerdo al método presentado en la publicación de 2013 (9).

---

3 La prueba de la botella es un método complementario para analizar la resistencia a un insecticida utilizando la concentración de diagnóstico, así como múltiplos de esta para determinar la intensidad (16).



- Paso 2. Evaluar la intensidad de la expresión fenotípica de la resistencia efectuando pruebas con cinco veces y diez veces (5x y 10x) la concentración discriminante de insecticida.
- Paso 3. Determinar la intervención de mecanismos metabólicos de resistencia evaluando los efectos de un sinergista, como el butóxido de piperonilo (PBO), en los fenotipos resistentes detectados en los pasos 1 y 2.

Esta versión ampliada tiene por objetivo hacer más fácil la obtención de datos completos y que sean de utilidad para tomar decisiones sobre la manera de responder a una eventual resistencia a los insecticidas. La prueba de la botella de los CDC ofrece la posibilidad de realizar la prueba a las concentraciones de 1x, 2x, 5x y 10x. Los datos resultantes de esta prueba permiten confiar en mayor medida en que los múltiplos de una concentración discriminante aportan información útil y son aplicables también a las pruebas de susceptibilidad de la OMS.

La OMS, que sigue recomendando su prueba clásica de susceptibilidad como principal método para detectar resistencia, juzgó sin embargo necesario actualizar los procedimientos vigentes de vigilancia (9) para tener más en cuenta la necesidad de generar datos útiles desde el punto de vista operativo. Obrando en consecuencia, convocó una consulta técnica para alimentar el proceso de actualización de dichos procedimientos, con los siguientes objetivos específicos:

- ampliar los procedimientos actuales de la prueba de la OMS con el fin de generar datos que revistan más utilidad práctica para la vigilancia de la resistencia a los insecticidas en los vectores del paludismo, para adaptarse a la evolución de las formas de manejo de la resistencia;
- definir procedimientos para efectuar pruebas de intensidad de la resistencia con cinco veces (5x) y diez veces (10x) la concentración discriminante;
- proponer procedimientos de prueba para evaluar el efecto de sinergistas (como el PBO) en la expresión de fenotipos resistentes; y
- ofrecer una lista actualizada de las “concentraciones discriminantes” para mosquitos adultos, de los insecticidas recomendados para el control de vectores del paludismo.

La resistencia a los insecticidas es un rasgo cuantitativo, de intensidad variable. Por ello se recomienda que además de la prueba OMS ampliada, que se realiza con fines de vigilancia sistemática de la susceptibilidad, se realicen pruebas genéticas (reacción en cadena de la polimerasa, PCR) y bioquímicas (ensayos de actividad enzimática) complementarias. Asimismo, a la hora de tomar decisiones sobre el manejo de la resistencia, es importante haber realizado otras pruebas para determinar los mecanismos de resistencia y la intensidad con que se expresan y disponer de herramientas adecuadas para rastrear su propagación.

Toda vez que los procedimientos de prueba para determinar la susceptibilidad a larvicidas se siguen considerando válidos, no se incluyen en el presente documento. El lector interesado en la evaluación de larvicidas puede consultar los documentos originales, que la OMS tiene a disposición pública (8, 17). No obstante, en la sección 5 se presenta el procedimiento de prueba en botella de los CDC.



### 3. PRUEBA OMS DE SUSCEPTIBILIDAD PARA MOSQUITOS ADULTOS

La prueba de susceptibilidad de la OMS es una prueba de respuesta directa a la exposición, que mide la mortalidad de mosquitos al ser expuestos a una concentración estándar conocida de determinado insecticida, ya se trate de una concentración discriminante o de múltiplos de esta, utilizados para determinar la intensidad. En el recuadro 3.1 se resume el procedimiento de prueba propiamente dicho.

#### 3.1 Pruebas de susceptibilidad a la concentración discriminante

El concepto de concentración discriminante (o de diagnóstico), está bien establecido y se utiliza de forma generalizada en las pruebas de detección y vigilancia de la resistencia a los insecticidas en mosquitos y otros vectores de enfermedades (9, 10, 18, 19). En el recuadro 3.2 se explica el uso de concentraciones discriminantes con fines de vigilancia sistemática de la resistencia a los insecticidas.

Para todos los insecticidas actualmente utilizados en los programas de lucha antipalúdica ya se ha definido una concentración discriminante en condiciones normalizadas de laboratorio. Estas concentraciones, que ya figuraban en versiones anteriores de las directrices (7, 9, 10, 15), se presentan de nuevo aquí actualizadas. En las directrices publicadas en 1998 se incluyeron por primera vez, previo estudio multicéntrico, las concentraciones discriminantes de una serie de insecticidas piretroides (15). Las especies de anofelinos utilizadas en dicho estudio fueron *An. aconitus*, *An. albimanus*, *An. arabiensis*, *An. dirus*, *An. freeborni*, *An. gambiae s.s.*, *An. maculatus*, *An. minimus* y *An. stephensi*. Con posterioridad se han determinado las concentraciones discriminantes de otros cuatro compuestos insecticidas, aunque por ahora con carácter indicativo, y en espera de que el WHOPES confirme esos valores por medio de una validación multicéntrica.

Como parte de los kits de prueba de la OMS, que prepara la Universidad de Ciencias de Malasia (Universiti Sains Malaysia) bajo la dirección de la OMS, se suministran papeles impregnados de insecticida a la correspondiente concentración discriminante (véase también la sección 3.7.3). A fin de garantizar la muerte de todos los mosquitos susceptibles, al definir las concentraciones discriminantes la OMS ha aplicado uno de los dos criterios siguientes:

- el doble de la concentración más baja que sistemáticamente dé lugar a un 100% de mortalidad (es decir,  $CL_{100}$ ) en una cepa de laboratorio susceptible o una población silvestre susceptible de mosquitos después de 60 minutos de exposición y un periodo de espera de 24 horas; o bien
- el doble de los valores de  $CL_{99,9}$  obtenidos en las pruebas destinadas a determinar la susceptibilidad de referencia con una cepa de laboratorio susceptible o una población silvestre susceptible de mosquitos.

Una población susceptible es aquella que no ha estado sometida a presión selectiva por insecticidas y no alberga, o alberga muy pocos, individuos resistentes.



En el cuadro 3.1 se relacionan las concentraciones discriminantes y las concentraciones de prueba de la intensidad recomendadas por la OMS para determinar la susceptibilidad a los insecticidas de mosquitos anofelinos adultos con las pruebas de susceptibilidad de la OMS. También se presentan las concentraciones de sinergista que deben utilizarse en las pruebas que combinan sinergistas e insecticidas. En el recuadro 3.1 se expone el método para llevar a cabo estas pruebas.

En la mayoría de los países también es necesario vigilar la resistencia a los insecticidas en otros vectores (p.ej. los mosquitos *Aedes*). Dado que la metodología es la misma que la utilizada para los mosquitos *Anopheles*, en el anexo 4 se presentan las concentraciones discriminantes y el tiempo de exposición de los insecticidas utilizados habitualmente contra los mosquitos *Aedes*.

### 3.2 Pruebas de susceptibilidad para determinar la intensidad de la resistencia

Se decidió añadir a la prueba OMS de susceptibilidad para mosquitos adultos ciertos insecticidas a cinco y diez veces la concentración discriminante (5x) y (10x), porque los fenotipos resistentes detectados con la concentración discriminante no ofrecen necesariamente información sobre la pérdida de eficacia del insecticida en campo. También se propuso que todo fenotipo de resistencia detectado con una concentración discriminante fuera objeto de nuevos análisis para valorar su posible relevancia desde el punto de vista operativo, exponiendo para ello nuevas muestras de mosquitos de la misma población de vectores a concentraciones sustancialmente superiores del insecticida en cuestión. Aunque esas concentraciones superiores de cada insecticida no corresponden a las tasas recomendadas de aplicación en campo, sí ofrecerán información útil acerca de la intensidad de la resistencia, o la “fuerza” con que se expresa el fenotipo (o los fenotipos) de resistencia en cuestión, información que se puede usar para la toma de decisiones operativas como la de sustituir el insecticida utilizado para el RRI o la de introducir un compuesto no piretroide para rociar interiores en zonas donde la principal intervención sea la distribución de mosquiteros insecticida de larga duración (MILD).

Así pues, la prueba OMS de susceptibilidad para mosquitos adultos ha sido ampliada para incluir en ella, por pasos, el uso de cinco y diez veces la concentración discriminante, con el propósito de obtener información sobre el rango (de haberlo) de fenotipos resistentes presentes en la población de vectores estudiada y su posible relevancia desde el punto de vista operativo. El diagrama de flujo presentado en la figura 3.1 ilustra los criterios aplicados en cada paso. En el cuadro 3.1 se muestran las

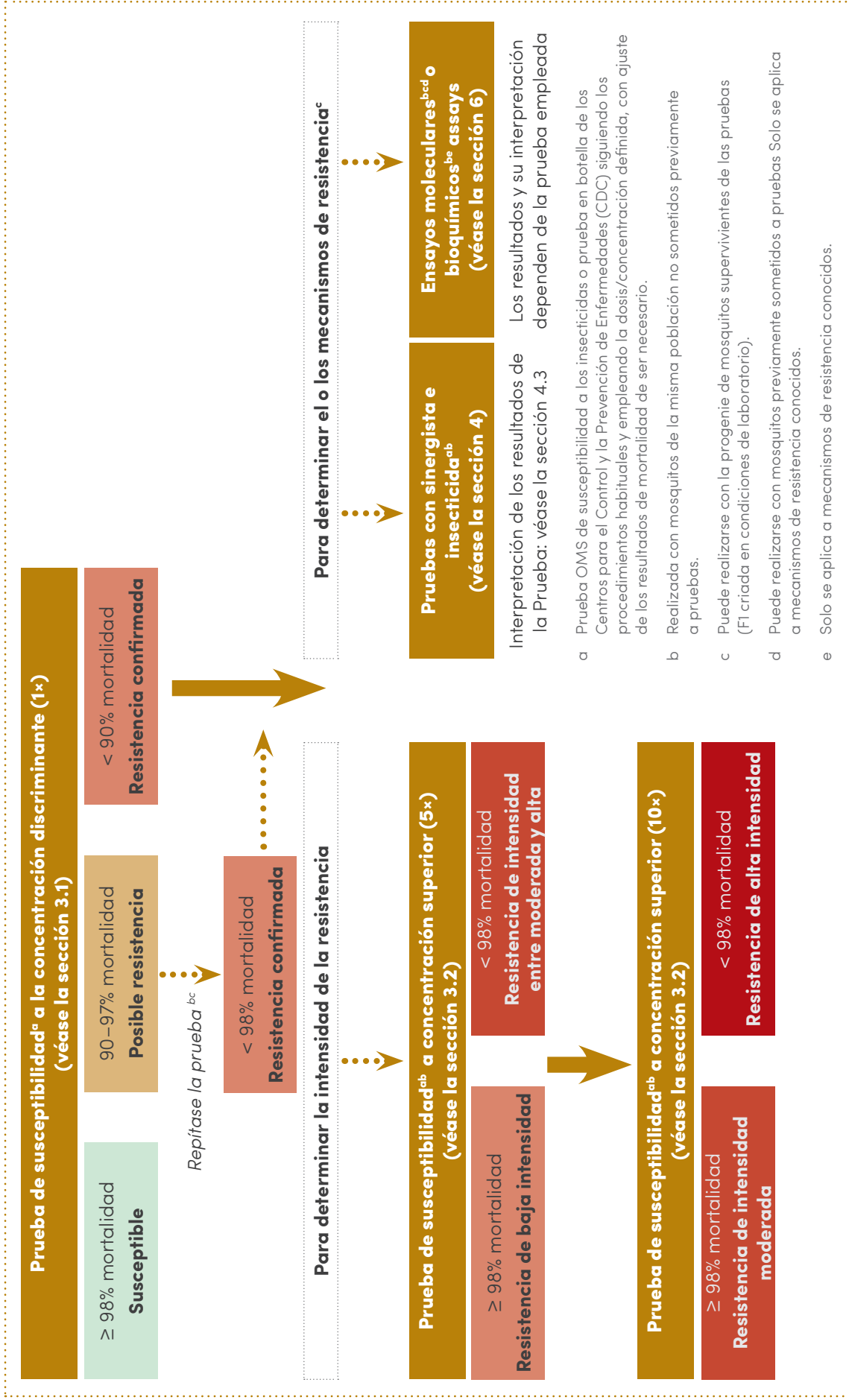


FIG. 3.1

**Proceso para efectuar las pruebas de susceptibilidad a un determinado insecticida para vectores de paludismo empleando la concentración discriminante establecida (1x), así como múltiplos de ella (5x y 10x) para determinar la intensidad de la resistencia (también se indican otras líneas de estudio en laboratorio y en campo con relación a los mecanismos de resistencia)**

concentraciones 5x y 10x de una selección de compuestos insecticidas, presentados aquí porque son los más usados o porque la preparación de papeles con estos insecticidas es técnicamente factible.

CUADRO 3.1.

**Concentración discriminante y concentraciones 5x y 10x de insecticida para la prueba de la susceptibilidad de mosquitos anofelinos adultos con la prueba OMS de susceptibilidad a los insecticidas, y concentración de piperonilo como sinergista para pruebas con sinergista e insecticida**

CLASE DE INSECTICIDA	INSECTICIDA	CONCENTRACIÓN DISCRIMINANTE (%) (1 HORA DE EXPOSICIÓN)	CONCENTRACIÓN 5.ª (%) (1 HORA DE EXPOSICIÓN)	CONCENTRACIÓN 10.ª (%) (1 HORA DE EXPOSICIÓN)	PAPEL CONTROL (ACEITE DE)	OBSERVACIONES
Carbamatos	Bendiocarb	0,1	0,5	1	Oliva	Tentativa, pendiente de confirmación por el WHOPEs. Basada en datos publicadas por N'Guessan <i>et al.</i> (2003) (20) y por Ahoua Alou <i>et al.</i> (2010) (21).
	Carbosulfan	0,4			Oliva	
	Propoxur	0,1			Oliva	Es preciso analizar la resistencia a estos insecticidas siempre que sea posible, pero ello no significa necesariamente que la OMS recomiende su utilización para el control de vectores de paludismo.
	DDT	4			Risella	
Organoclorados		0,4			Risella	
	Dieldrin	4			Risella	Se puede analizar la resistencia al dieldrin cuando sea posible, pero ello no significa necesariamente que la OMS recomiende su utilización para el control de vectores de paludismo. La exposición a dieldrin al 0,4% mata a los individuos susceptibles (SS), pero no a los resistentes heterocigotos (RS); la exposición a dieldrin al 4% mata a los resistentes heterocigotos (RS), pero no a los homocigotos (RR). Tiempo de exposición: 2 h.
Organofosforados	Fenitrotión	1			Oliva	
	Malatión	5			Oliva	
	Pirimifos metil	0,25	1,25	2,5	Oliva	Tentativa, basadas en datos inéditos de empresas, 2006; pendientes de confirmación por el WHOPEs.



CLASE DE INSECTICIDA	INSECTICIDA	CONCENTRACIÓN DISCRIMINANTE (%) (1 HORA DE EXPOSICIÓN)	CONCENTRACIÓN 5. <sup>a</sup> (%) (1 HORA DE EXPOSICIÓN)	CONCENTRACIÓN 10. <sup>a</sup> (%) (1 HORA DE EXPOSICIÓN)	PAPEL CONTROL (ACEITE DE)	OBSERVACIONES
Piretroides	Alfacipermetrina	0,05	0,25	0,5	Silicona	Tentative; to be confirmed by WHOPEs.
	Ciflutrina	0,15	0,75	1,5	Silicona	
	Deltametrina	0,05	0,25	0,5	Silicona	
	Etofenprox	0,5	2,5	5	Silicona	
Piretroides	Lambdacialotrina	0,05	0,25	0,5	Silicona	
	Permetrina	0,75	3,75	7,5	Silicona	
Fenilpirazoles	Fipronil	2			Silicona	Tentativa, basada en datos publicados por Kolaczinski y Curtis (2001) (22) y por Brooke <i>et al.</i> (2000) (23); pendiente de confirmación por el WHOPEs.
						Aunque la OMS no recomienda su utilización para el control de vectores de paludismo, se puede analizar la resistencia al fipronil cuando sea posible.
Sinergista	Butóxido de piperonilo	4			Silicona	

DDT: diclorodifeniltricloroetano; WHOPEs, Plan de evaluación de plaguicidas de la Organización Mundial de la Salud.

° La estabilidad y el uso de concentraciones superiores no están validados actualmente por el WHOPEs. Solo se proponen concentraciones superiores en el caso de algunos insecticidas de uso muy extendido. Debido a los límites de solubilidad, quizá no sea posible impregnar los papeles de filtro a algunas de las concentraciones superiores.

Nota. Aún no se dispone de concentración discriminante para los insecticidas dlotianidina (neonicotinoide) y clorfenapir (pirrol).

Fuentes: Salvo que se indique lo contrario, datos basados en OMS, 1992 (19) y OMS, 1998 (10).



### RECUADRO 3.1.

#### **MEDICIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS EN MOSQUITOS ADULTOS: PROCEDIMIENTOS DE LA PRUEBA OMS DE SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS PARA LAS CONCENTRACIONES DISCRIMINANTES Y LAS CONCENTRACIONES 5X Y 10x**

1. El investigador debe llevar guantes. Se introducen seis hojas de papel blanco limpio (12 × 15 cm), enrolladas en forma de cilindro, en otros tantos tubos de mantenimiento (con punto verde), una por tubo, y se forra la pared interna del tubo sujetando el papel con un clip de alambre. Después se fija la unidad corrediza al otro extremo de cada tubo.
2. Lo ideal es aspirar (por lotes) de 120 a 150 hembras activas de mosquitos, haciéndolas pasar de la jaula a los seis tubos de mantenimiento (punto verde) a través del orificio de llenado de la unidad corrediza, para obtener a la postre seis muestras iguales de 20 a 25 mosquitos por tubo.
3. Una vez transferidos los mosquitos, se cierra la unidad corrediza y se dejan los tubos de mantenimiento en posición vertical durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se extrae todo mosquito que esté moribundo (es decir, sea incapaz de volar) o muerto.<sup>a</sup>
4. El investigador introduce un papel impregnado de aceite (el control) en los dos tubos marcados con un punto amarillo, asegurándose de que la etiqueta del papel sea visible a través del tubo. Tras sujetar el papel con un clip de cobre, se cierra el tubo con el tapón de rosca.
5. La preparación de los cuatro tubos de exposición (con punto rojo) se hace de la misma forma que la de los tubos marcados de amarillo. Se forra el interior de cada uno de los cuatro tubos de exposición con una hoja de papel impregnado de insecticida, de tal modo que la etiqueta del papel sea visible desde el exterior. Después se fija el papel contra la pared del tubo sujetándolo con un clip de alambre de cobre y se cierra el tubo con el tapón de rosca.
6. Se enroscan los tubos de exposición vacíos a las unidades corredizas, y con la unidad corrediza abierta se sopla suavemente para hacer pasar los mosquitos de los tubos de mantenimiento a los de exposición. Una vez todos los mosquitos se han introducido en los tubos de exposición, se cierra la unidad corrediza (generalmente se coloca un tapón de algodón en el orificio pequeño para bloquear la corredera) y se separan y dejan aparte los tubos de mantenimiento. Llegado a este punto, el investigador puede quitarse los guantes.
7. Se dejan los tubos de exposición, con los mosquitos dentro, en posición vertical con el extremo mallado hacia arriba durante 1 hora (o el tiempo de exposición especificado, si es distinto), en un lugar poco iluminado o cubiertos con discos de cartulina para reducir la intensidad luminosa y evitar que los mosquitos se queden posados en la tapa mallada.
8. Después de un tiempo de exposición de 1 hora (o más, en el caso de ciertos compuestos, como se indica en el cuadro 3.1), se devuelven los mosquitos a los tubos de mantenimiento realizando a la inversa el procedimiento expuesto en el paso 6. Se separan las unidades corredizas de los tubos de exposición. En el extremo mallado de los tubos de mantenimiento se coloca una almohadilla de algodón empapada de agua azucarada al 10%.

9. Se dejan los mosquitos en los tubos de mantenimiento durante 24 horas (o más, en el caso de compuestos de acción lenta). Durante todo este tiempo, es importante que los tubos estén en un lugar sombreado y protegido del laboratorio o en una cámara mantenida a  $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  de temperatura y  $75\% \pm 10\%$  de humedad relativa. Es preciso registrar la temperatura y la humedad relativa durante el periodo de recuperación.
10. Al término del periodo de recuperación (es decir, 24 horas después de la exposición, o más en el caso de compuestos de acción lenta), se cuenta y anota el número de mosquitos muertos<sup>a</sup>. Se considera que un mosquito adulto está vivo si puede volar, independientemente del número de patas que le queden. Todo mosquito que esté derribado, haya o no perdido patas o alas, será considerado moribundo y contado como muerto. Se clasificará como muerto o derribado todo mosquito que esté inmóvil o sea incapaz de tenerse en pie o alzar el vuelo.

Al término de la prueba de susceptibilidad se pueden transferir los mosquitos a tubos de microcentrífuga individuales claramente etiquetados con un tapón que cierre herméticamente (colocando en tubos distintos a los mosquitos muertos y a los vivos), a fin de conservarlos hasta que llegue el momento de transportarlos a instalaciones adecuadas para identificar la especie y proceder a pruebas complementarias, de ser necesario. En la figura 3.2 se muestra esquemáticamente el procedimiento.

<sup>a</sup> Para efectos de las pruebas, en la definición de *derribado* (*knocked-down*) y *muerto* se tiene en cuenta no solo el estado del insecto, sino también el momento en el que se efectúa la observación. Se considera que un mosquito está "muerto" o "derribado" cuando está inmóvil o es incapaz de tenerse en pie o alzar el vuelo. La diferencia entre *derribado* y *muerto* depende solamente del momento de la observación: se determina si un individuo está *derribado* dentro de la hora siguiente a la exposición, mientras que la mortalidad se determina como mínimo 24 horas después de la exposición. Cabe golpear varias veces el tubo de mantenimiento antes de proceder a la observación final. En el caso de insecticidas de acción lenta, el periodo de recuperación (espera) puede ser superior a 24 horas. Hay que respetar el mismo periodo de recuperación para medir la mortalidad registrada en los controles. Es preciso anotar la mortalidad al cabo de 24 horas y, en algunos casos, quizá convenga efectuar observaciones repetidas. A continuación se resumen los criterios de clasificación de los mosquitos adultos en vivos, derribados o muertos que se aplican en una prueba.

VIVOS	DERRIBADOS O MUERTOS TRAS LA EXPOSICIÓN	
	DERRIBADOS	MUERTOS
Pueden tenerse en pie y volar de forma coordinada	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No pueden tenerse en pie (p.ej. solo tienen una o dos patas)</li> <li>• No pueden volar de forma coordinada</li> <li>• Yacen sobre el dorso, moviendo patas y alas pero sin poder alzar el vuelo</li> <li>• Pueden tenerse en pie y alzar el vuelo brevemente, pero caen rápidamente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No dan señales de vida</li> <li>• Están inmóviles</li> <li>• No se tienen en pie</li> </ul>

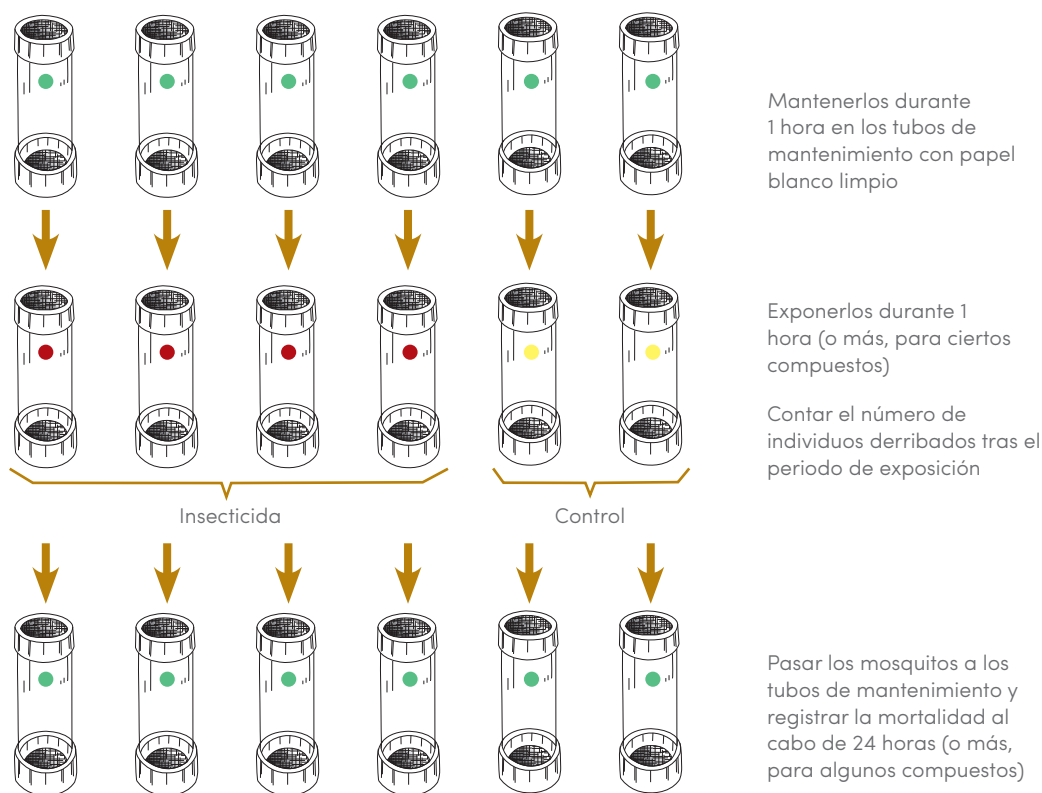


FIG. 3.2  
**Pasos para realizar la prueba OMS de susceptibilidad a los insecticidas para la concentración discriminante y las concentraciones 5x y 10x**

**RECUADRO 3.2.**  
**DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA EN POBLACIONES DE VECTORES**

**Uso de la concentración discriminante**

Para detectar una eventual resistencia en poblaciones de vectores es necesario contar ante todo con datos sobre la susceptibilidad de referencia a distintos insecticidas en una población normal o "susceptible" de la especie en cuestión. Para ello hay que exponer vectores no resistentes a papeles de filtro impregnados de concentraciones seriadas de un determinado compuesto insecticida y representar gráficamente la mortalidad porcentual frente a la exposición en un papel con escala de probabilidad logarítmica. Después se puede utilizar el gráfico para estimar las concentraciones requeridas para inducir distintos niveles de mortalidad, cálculo que también cabe realizar utilizando un modelo estadístico log-probit. Con este método se puede obtener la concentración correspondiente a una mortalidad del 99,9% (el valor  $CL_{99,9}$ ). A esta concentración hay una elevada probabilidad de que mueran todos los ejemplares de una población susceptible. Por convención, se considera que el doble de esta concentración es la "concentración





---

discriminante" (o de diagnóstico) (esto es, 1x). Una vez determinada la concentración discriminante de un insecticida en condiciones normalizadas de laboratorio utilizando cepas o poblaciones susceptibles de diversas especies de mosquitos vectores, no será necesario, para los fines de vigilancia sistemática, realizar pruebas de susceptibilidad a todo el espectro de concentraciones de prueba. En lugar de ello, bastará con realizar una prueba normal de la resistencia empleando la concentración discriminante, tras lo cual se podrá considerar resistente a todo individuo que sobreviva a esta concentración. Este método presenta ventajas obvias desde el punto de vista de la factibilidad, el costo y la eficiencia de las pruebas. Sin embargo, la confirmación de una resistencia a la concentración discriminante no tiene por qué significar necesariamente la inoperancia de las formulaciones insecticidas empleadas para el RRI o la impregnación de mosquiteros en el campo. Cuando se trate de fundamentar decisiones de carácter operativo es necesario realizar otros ensayos concebidos para determinar el grado de intensidad de la resistencia (véase más adelante). Ya están establecidas, para distintas especies de mosquitos, las concentraciones discriminantes de varios compuestos insecticidas utilizados en la lucha antivectorial o evaluados como parte de procesos de investigación (Cuadro 3.1). Cuando se trate de nuevos compuestos insecticidas o de especies de mosquito que no sean objeto de vigilancia sistemática, o en situaciones específicas en las que no se disponga de datos de referencia, será necesario determinar inicialmente la línea base de susceptibilidad como se mencionó anteriormente.

#### **Uso de las concentraciones 5x y 10x para determinar la intensidad**

Para valorar los efectos que pueda tener en campo un fenotipo resistente detectado con concentraciones discriminantes de insecticidas, cabe exponer muestras adicionales de mosquito a las correspondientes concentraciones 5x y 10x. La exposición a estas concentraciones superiores aportará información sobre la intensidad de la resistencia, que puede ser definida como la "fuerza" de un fenotipo de resistencia. Según los criterios propuestos, la presencia de niveles confirmados de resistencia a cinco veces (5x), y especialmente a diez veces (10x), la concentración discriminante, puede indicar o predecir que las medidas de control resultarán inoperantes y señalar así la especial urgencia de elaborar una estrategia adecuada de manejo de la resistencia (5). En la sección 3.6 se ofrecen indicaciones sobre la forma de interpretar este tipo de resultados.

---

### **3.3 Protocolos de muestreo**

#### **3.3.1 Selección de los ejemplares de prueba**

La edad, el estado fisiológico y el sexo de los mosquitos son factores importantes, que pueden influir en los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los insecticidas. Para las labores de vigilancia de la resistencia no se aconseja el uso de machos, que en general son más pequeños, tienen menor esperanza de vida y son más frágiles que las hembras, por lo cual suelen registrar una mayor mortalidad en las pruebas. Para llevar a cabo las pruebas de susceptibilidad, por consiguiente, se utilizan solo mosquitos hembra.

Los estudios con hembras adultas de mosquito han demostrado repetidamente que tanto la edad como el estado fisiológico (en ayunas o alimentadas de sangre, semigrávidas o grávidas) tienen un marcado efecto sobre la susceptibilidad a los insecticidas. Los mosquitos de mayor edad, por ejemplo, son a veces menos resistentes, sobre todo cuando el factor que confiere resistencia es la presencia de



un enzima desintoxicante, cuya actividad puede decaer con la edad (24). Por ello se recomienda efectuar las primeras pruebas de susceptibilidad a la concentración discriminante empleando hembras adultas de 3 a 5 días de edad que no hayan ingerido sangre (esto es, alimentadas con azúcares y en ayunas desde al menos 6 horas antes). Para los ensayos con las concentraciones 5x y 10x se deben emplear igualmente hembras que no hayan ingerido sangre. En algunas circunstancias resultará más sencillo efectuar las pruebas con hembras de más edad capturadas en campo, porque las hembras mayores que andan en busca de sangre son la cohorte epidemiológicamente importante de las poblaciones de vectores.

Con objeto de obtener resultados normalizados por edad, se recomienda efectuar las pruebas de susceptibilidad utilizando hembras adultas procedentes de colecciones de larvas (siendo esta la opción idónea) o, cuando ello no sea posible, la progenie F1 de hembras capturadas en campo. Cuando se utilicen colecciones de larvas, antes de realizar la prueba cabe la posibilidad de acumular las muestras correspondientes a un mismo lugar y un mismo tipo de criadero para disponer de un número suficiente de insectos. No obstante, lo ideal es realizar las colecciones de larvas en diferentes lugares de reproducción, pues ello evita reunir en la muestra a los descendientes de un solo lote de huevos, lo que podría dar lugar a una elevada proporción de ejemplares hermanos en la población analizada. De la misma forma, la progenie de una hembra adulta presenta una variabilidad genotípica limitada, por lo cual lo idóneo es que las hembras capturadas en campo provengan de diferentes sitios, con lo que se obtendrá una muestra representativa de la diversidad presente en la población local. En la práctica, ello significa que a partir de las hembras capturadas en campo se deben criar como mínimo 30 lotes de huevos (o más, si hay una mezcla de especies).

Cuando se utilicen colecciones de larvas para obtener hembras jóvenes adultas con fines de vigilancia de la resistencia, es importante registrar el tipo de hábitat larvario (p.ej. arrozal, sumidero de agua lluvia, canal de irrigación, pozo, etc.) y las coordenadas del sistema global de localización (GPS) de donde provenga la colección, porque:

- la exposición a residuos de plaguicidas diferirá según el lugar de reproducción; y
- dentro de un mismo complejo de especies, algunos taxones tendrán preferencia por uno u otro tipo de hábitat larvario (p.ej., es más probable que *An. coluzzii* se reproduzca en arrozales, mientras que *An. gambiae* s.s. tiende a predominar en los sistemas de captación de agua lluvia).

Una tercera opción consiste en utilizar directamente hembras capturadas en campo. En tal caso se deberán seleccionar y someter a prueba únicamente hembras que no estén alimentadas con sangre. De ser necesario, se les puede proporcionar agua azucarada para que resistan y a continuación, unas horas antes de la prueba, dejarlas ayunar.

La principal ventaja de emplear directamente hembras capturadas en campo es que ello resulta cómodo y que constituyen la población que tiene relevancia desde el punto de vista operativo. El principal inconveniente es que se desconoce su edad, lo que puede dar lugar a una mayor variabilidad en los resultados de la prueba (y seguramente a una subestimación de la resistencia), dependiendo de la distribución de la especie y del insecticida estudiado. En el cuadro 3.2 se presentan las ventajas relativas de emplear directamente hembras capturadas en campo o la progenie F1 de esas hembras.

CUADRO 3.2.

**Ventajas e inconvenientes de efectuar pruebas con la progenie F1 o con hembras capturadas en campo**

MUESTRA	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Progenie F1	<p>Se puede mantener constante la edad de los vectores entre pruebas, lo que permite comparar resultados correspondientes a distintos momentos y lugares.</p> <p>Puede ser utilizada en zonas con baja densidad de mosquitos, aun cuando no sea posible capturar un número suficiente de hembras adultas.</p>	<p>Se necesitan mejores instalaciones entomológicas, lo que restringe el número de lugares donde pueden efectuarse las pruebas.</p> <p>Las condiciones del insectario difieren de las del medio natural.</p> <p>Dado que muchos huevos quizá provengan de unas pocas hembras adultas, el número de genomas de la población presentes en la muestra será seguramente menor que el de insectos analizados.</p>
Hembras capturadas en campo	<p>Se necesitan menos instalaciones, con lo que hay más lugares donde es posible efectuar las valoraciones.</p> <p>Los cambios en la susceptibilidad serán un reflejo más fiel de los cambios en la eficacia de las intervenciones observados sobre el terreno.</p> <p>La distribución de edades de los vectores debería ser representativa de la población de campo en un lugar y un momento dados.</p>	<p>La distribución de edades y el estado fisiológico de los vectores difieren de una muestra a otra, con lo que los resultados son menos comparables.</p> <p>Es posible que los mosquitos hayan experimentado previamente una exposición no letal al insecticida.</p> <p>Las hembras capturadas en campo pueden estar infectadas, por lo que hay que manejarlas con cuidado.</p>

Adaptado de Mnzava *et al.* (2015) (4).

**3.3.2 Distribución espacial y frecuencia de las pruebas de susceptibilidad**

En las ediciones anteriores de estas directrices no se formulaban recomendaciones específicas sobre la cronología y frecuencia con que deben realizarse las pruebas de susceptibilidad, pero sí se indicaba que la comparación de los datos de resistencia obtenidos a lo largo del tiempo en un centro de vigilancia “centinela” resulta útil para discernir tendencias temporales. De la misma forma, el hecho de comparar los datos de pruebas realizadas en distintos lugares ofrece información interesante sobre la distribución geográfica de la resistencia.

La frecuencia de la resistencia, la prevalencia de los mecanismos que la inducen y la distribución relativa de las poblaciones de distintos taxones en una misma localidad varían sensiblemente con el tiempo. Por ello mantiene toda su vigencia la recomendación actual, a saber: determinar la susceptibilidad de los vectores a las clases de insecticidas, cuya aplicación recomienda la OMS, como mínimo una vez al año o siguiendo los cambios estacionales (que pueden influir en la distribución de especies, la abundancia relativa y los patrones de susceptibilidad de los vectores) o el calendario de los cultivos agrícolas. A la hora de determinar las clases de insecticidas que se vayan a someter a prueba, el personal de vigilancia debe privilegiar aquellas que se estén utilizando en la localidad o cuyo uso se contemple, dependiendo de la disponibilidad de muestras de mosquitos. En relación con la cronología y frecuencia de las pruebas de susceptibilidad, se proponen las siguientes posibles estrategias.



- Para determinar la distribución de la resistencia, las actividades de vigilancia deben realizarse a través de una red de sitios “centinela” seleccionados de tal modo que ofrezcan resultados representativos de las diversas especies de vectores, zonas ecoepidemiológicas e intensidades de transmisión de paludismo presentes en un determinado país. En aquellos lugares donde se haya eliminado la transmisión o se encuentren en etapas cercanas a la eliminación, se debe dar prioridad a la vigilancia en focos de transmisión y áreas de brotes localizados, o bien en zonas donde se observe un aumento de los casos de la enfermedad.
- Cabe la posibilidad de efectuar repetidas pruebas en los mismos lugares para hacer un seguimiento a los cambios que experimente con el tiempo la susceptibilidad de los mosquitos, dependiendo del tamaño o la densidad de la población de vectores.
- Las zonas donde se utilice un mismo insecticida con fines de lucha antivectorial y de producción agrícola pueden requerir una frecuencia más intensiva de vigilancia, pues existe la posibilidad de que los usos agrícolas del producto acentúen la presión selectiva en favor de la aparición de resistencia en las poblaciones de vectores.
- Teniendo en cuenta la heterogénea distribución de la resistencia a los insecticidas, una alternativa a la red de centros “centinela” consiste en efectuar pruebas sistemáticas de vigilancia a escala de distrito o municipalidad, y otra en vigilar la resistencia a lo largo de transectos debidamente definidos.

### 3.3.3 Tamaño muestral

Para realizar una prueba de susceptibilidad a los insecticidas de la OMS lo ideal es disponer de 120 a 150 hembras adultas de mosquitos de una determinada especie. De ellas, 100 serán expuestas al insecticida estudiado (en cuatro o cinco réplicas, de unos 20 a 25 ejemplares cada una). Los 50 mosquitos restantes servirán de “controles” (esto es, dos réplicas de unos 20 a 25 ejemplares cada una). Cuando se someta a prueba más de un insecticida, se requerirán otros tantos lotes de mosquitos para cada insecticida adicional.

Los mosquitos de control son expuestos a papeles impregnados solo con el correspondiente aceite portador, esto es, sin insecticida (véase el cuadro 3.1). En todos los demás sentidos, los mosquitos de control pasan por el mismo tratamiento que los mosquitos expuestos al insecticida (es decir, son sometidos a prueba simultáneamente y en idénticas condiciones). La inclusión de controles sirve para poder estimar la mortalidad natural durante la prueba y tener en cuenta todas las variables que puedan inducir mortalidad aparte del propio insecticida. En la presente versión de las directrices se recomienda efectuar la prueba con al menos dos controles (esto es, 40 a 50 mosquitos), con el fin de obtener resultados estadísticamente más significativos.

Si no es posible reunir de una sola vez un número suficiente de mosquitos (p.ej. si se trabaja con hembras capturadas en campo), cabe la posibilidad de mantener a los mosquitos vivos hasta disponer de una cantidad suficiente. Cuando se utilicen hembras adultas criadas a partir de larvas o la progenie F1, también será posible acumularlas en jaulas hasta contar con un número suficiente, teniendo presente la franja de edad de 3 a 5 días. Cuando se trabaje con una muestra combinada, habrá que permitir que los mosquitos tengan acceso a agua azucarada hasta unas horas antes de proceder a la prueba.

Cuando haya indicios de resistencia a un insecticida (es decir, cuando haya supervivientes a la concentración discriminante) será preciso efectuar pruebas complementarias para dilucidar el o los mecanismos de resistencia subyacentes. Para ello se pueden combinar las pruebas con sinergistas con técnicas moleculares o bioquímicas, o ambas (véase la sección 6). Para las pruebas bioquímicas se requieren muestras nuevas de mosquitos, por lo cual quizá haya que recolectar más ejemplares o, cuando se utilicen colecciones de larvas, reservar un subconjunto de los ejemplares que emerjan (véase la sección 6).

### 3.3.4 Determinación de especies

En muchas regiones donde el paludismo es endémico suelen coexistir en simpatria varias especies de mosquito pertenecientes al mismo grupo o complejo. El complejo de especies *An. gambiae*, por ejemplo, comprende ocho especies crípticas (*An. gambiae* s.s., *An. coluzzii*, *An. arabiensis*, *An. bwambae*, *An. melas*, *An. merus*, *An. quadriannulatus* y *An. amharicus*) que generalmente se encuentran en simpatria con especies vectoras, pero no todas ellas están implicadas en la transmisión del paludismo. Otros ejemplos de complejos y grupos de especies son *An. culicifacies*, *An. fluviatilis*, *An. funestus*, *An. dirus*, *An. minimus*, *An. nuneztovari* y *An. albitarsis*. Dado que los diferentes miembros de un mismo complejo de especies no comparten necesariamente los mismos mecanismos de resistencia ni exhiben los mismos patrones de resistencia a los insecticidas, es esencial identificar hasta el nivel de especie a los ejemplares recogidos en campo.

La identificación morfológica de las especies y de los complejos o grupos de especies debe efectuarse después de haber realizado las pruebas de susceptibilidad a los insecticidas. Ello permite calcular con exactitud la mortalidad porcentual por especie o grupo de especies y, de ser necesario, conservar y etiquetar debidamente los insectos para posteriores ensayos en laboratorio. El advenimiento de técnicas moleculares ha hecho posible distinguir con relativa rapidez y facilidad entre los miembros de cada complejo de especies de mosquito gracias a sencillas pruebas de PCR. Con esta técnica es posible, después de la prueba, identificar la especie de los ejemplares tanto vivos como muertos tras la exposición, así como de los integrantes del grupo de control. Antes de proceder a la identificación por PCR, los ejemplares en cuestión deben ser conservados en gel de sílice o en etanol. Para evitar la contaminación cruzada de ADN se puede conservar individualmente cada mosquito en un tubo de microcentrífuga de 0,5 ml.

Existen una serie de criterios clave para realizar la identificación morfológica de los mosquitos recolectados en distintas regiones. En la publicación *Methods in Anopheles research manual* (25) se exponen métodos moleculares adecuados para identificar hasta el nivel de especie a muchos vectores del paludismo.

Lo idóneo es determinar la especie de todos los mosquitos sometidos a prueba, lo que permitirá calcular la mortalidad de cada especie por separado. Si no es posible identificar a todos los ejemplares, cabe utilizar una submuestra de 40 a 50 mosquitos por prueba. Esta submuestra debe incluir a todos los supervivientes más varios mosquitos muertos o, cuando haya numerosos supervivientes, limitarse solamente a estos. Cuando en la prueba se hayan empleado mosquitos de la progenie F1, bastará con determinar únicamente la especie de las madres de cada familia.



### 3.4 Condiciones y protocolos de prueba

En el recuadro 3.1 se han expuesto los pasos necesarios para llevar a cabo la prueba OMS de susceptibilidad. Como se ha dicho, el procedimiento apenas ha cambiado, en lo esencial, desde que en 1976 se recomendó su utilización como prueba de susceptibilidad de referencia (18). Aun así, a lo largo del tiempo se han ido introduciendo algunos cambios menores en los protocolos de prueba. En la revisión de 1998, por ejemplo, cuando se incluyeron por primera vez los piretroides, se especificó que los tubos de mantenimiento debían ser mantenidos en posición vertical durante los periodos de exposición y de espera (10).

La revisión de 2013 (9), al igual que la presente revisión, se acompaña de ciertos cambios pequeños en las condiciones y los protocolos de prueba recomendados, descritos a continuación. En el anexo 1 se presenta un modelo de formulario para registrar los datos de las pruebas de susceptibilidad, en particular con información detallada sobre la zona de estudio, los ejemplares que componen la muestra (método de recolección, edad, estado fisiológico y especie), el o los insecticidas analizados y las condiciones experimentales.

#### 3.4.1 Número de mosquitos sometidos a prueba

Como queda dicho, para cada insecticida conviene someter a prueba de 120 a 150 mosquitos hembra a la concentración discriminante, con al menos cuatro réplicas de 20 a 25 ejemplares por ensayo. Cuando no sea posible analizar este número de mosquitos en un solo día, cabe la posibilidad de repartir las pruebas en varios días hasta que se alcance dicho número, siempre y cuando se incluyan paralelamente controles. En este caso, y a fin de evitar múltiples manipulaciones, se pueden dejar los papeles impregnados dentro de los tubos, a condición de que estos estén envueltos en papel de aluminio y sean mantenidos a 4 °C entre un ensayo y el siguiente. En la presente revisión se recomienda un mínimo de dos controles (40 a 50 mosquitos) con objeto de mejorar la validez estadística de los resultados.

#### 3.4.2 Condiciones ambientales

La temperatura ambiental puede influir en la toxicidad de los insecticidas (26), y la humedad relativa puede afectar a la supervivencia de los mosquitos durante el periodo de espera. Por ello es preciso controlar la temperatura y la humedad durante las fases de prueba y espera. Lo idóneo es que los ensayos se realicen a 25 °C  $\pm$  2 °C de temperatura y a un 80%  $\pm$  10% de humedad relativa. Durante los periodos de exposición y espera hay que vigilar ambos parámetros y registrar los valores máximo y mínimo al principio del periodo de exposición y, de nuevo, al final del periodo de espera.

A lo largo de la prueba (fases de exposición y espera) los tubos de exposición y de mantenimiento deben permanecer en posición vertical, independientemente de la clase de insecticida de que se trate (incluso en el caso de insecticidas que inducen un rápido efecto de derribo, como los piretroides). Durante la fase de exposición es preciso cubrir con una cartulina los extremos que tienen malla de los tubos de exposición para reducir la intensidad luminosa. No hay que realizar prueba alguna a temperaturas superiores a los 30 °C. En ausencia de insectario o de nevera portátil que haga las veces de "insectario de campo", los tubos deben colocarse dentro de un contenedor recubierto con un paño humedecido que se dejará en un lugar protegido y sombreado.

### 3.4.3 Número de usos de los papeles impregnados

La eficacia de un papel impregnado disminuye con el número de usos y el número de mosquitos sometidos a prueba, sobre todo en el caso de los papeles impregnados de piretroides. La recomendación actual consiste en no utilizar un mismo papel impregnado de insecticida más de seis veces, lo que equivale a exponer unos 150 mosquitos en un solo tubo. En las versiones anteriores de estas directrices se admitía una mayor reutilización en el caso de papeles impregnados de un insecticida no piretroide (hasta 20 veces).

Entre dos pruebas sucesivas hay que guardar los papeles en su caja de plástico original, cerrada con cinta adhesiva y conservada a 4 °C dentro de un contenedor o nevera o, cuando ello no sea posible, en una alacena cerrada a temperatura ambiente. Cuando los papeles hayan permanecido a 4 °C habrá que llevarlos a la temperatura ambiente antes de utilizarlos para una prueba de exposición. Los papeles nunca deben quedar expuestos a luz solar directa. En cada caja está indicada la fecha de caducidad del lote en cuestión, que hay que respetar estrictamente.

## 3.5 Mortalidad y ajustes a los cálculos

En el anexo 2 se ofrece un modelo de formulario que cabe utilizar para registrar y comunicar las tasas de mortalidad y de derribo obtenidas en una prueba. La mortalidad (esto es, el número de mosquitos muertos en los tubos de exposición y en los de control) se determina al término del periodo post-exposición especificado.

La mortalidad de la muestra sometida a prueba se calcula sumando el número de mosquitos muertos en todas las réplicas expuestas y expresándolo como porcentaje del número total de mosquitos expuestos:

$$\text{Mortalidad observada} = \frac{\text{Total de mosquitos muertos}}{\text{Total de mosquitos expuestos}} \times 100$$

Para obtener el valor de la mortalidad del control se efectúa un cálculo similar. Si la mortalidad del control es  $\geq 20\%$ , la prueba debe ser desechada. Cuando sea  $< 20\%$ , se deberá corregir la mortalidad observada en los expuestos aplicando la fórmula de Abbott como sigue:

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

Cuando la mortalidad del control sea inferior al 5% (es decir, un mosquito muerto por cada 25), no se precisará corrección alguna de los resultados de la prueba, que sí deberá efectuarse cuando la mortalidad sea  $\geq 5\%$ .

Al presentar los recuentos de mortalidad siempre hay que indicar el tamaño de la muestra y también, de ser posible, ofrecer una estimación de los intervalos de confianza al 95%.



## 3.6 Interpretación de los resultados

### 3.6.1 Pruebas de susceptibilidad a la concentración discriminante

Teniendo en cuenta los nuevos descubrimientos y la necesidad de actuar rápidamente para frenar la dispersión de la resistencia en las poblaciones de vectores, en 2013 se revisaron los criterios de interpretación de los resultados de la prueba de susceptibilidad de la OMS (9). Para los ensayos realizados con la concentración discriminante rigen ahora las recomendaciones siguientes.

- Una mortalidad comprendida entre el 98% y el 100% indica que los mosquitos son susceptibles.
- Una mortalidad inferior al 98% permite suponer la existencia de resistencia y exige un análisis más detenido. Si la mortalidad observada (corregida, cuando proceda) está entre el 90% y el 97%, será preciso confirmar la presencia de genes de resistencia en la población del vector realizando pruebas adicionales con el mismo insecticida y con la misma población o con la progenie de alguno de los mosquitos supervivientes (criada en condiciones de insectario) o efectuando ensayos moleculares para detectar mecanismos de resistencia conocidos. Si al menos dos pruebas adicionales dan sistemáticamente una mortalidad inferior al 98%, se da por confirmada la resistencia.
- Cuando la mortalidad sea inferior al 90%, no harán falta pruebas adicionales para confirmar la existencia de genes resistentes en la población analizada, siempre y cuando se hayan sometido a prueba por lo menos 100 ejemplares de cada especie. En tal caso será preciso someter a prueba nuevas muestras a las concentraciones 5x y 10x, como se explica en la sección 3.6.2, y también investigar los mecanismos y la distribución de la resistencia.
- Cuando se confirme resistencia se recomienda, siempre que sea posible, adoptar medidas correctivas a fin de manejar la resistencia siguiendo las recomendaciones del Plan mundial (5) para preservar la eficacia de los insecticidas utilizados en el control de vectores de paludismo.
- Cuando se observe un número inesperadamente alto de supervivientes tras la exposición a un insecticida que en principio debía matar a todos los ejemplares sometidos a la prueba, será preciso efectuar una prueba con los mismos papeles empleando una colonia de laboratorio de *Anopheles* que sea susceptible al insecticida. Si no se dispone de las instalaciones necesarias para hacerlo, se deben enviar los papeles a un laboratorio o establecimiento regional en el que sea posible efectuar esas pruebas para comprobar la calidad de los papeles.

### 3.6.2 Pruebas de susceptibilidad a las concentraciones 5x y 10x

A continuación se resumen las recomendaciones para interpretar los resultados de las pruebas efectuadas con cinco y diez veces la concentración discriminante.

- Una mortalidad (corregida, cuando proceda) comprendida entre el 98% y el 100% a la concentración 5x indica una resistencia de baja intensidad, que hace innecesaria la valoración a la concentración 10x.
- Una mortalidad (corregida, cuando proceda) inferior al 98% a la concentración 5x indica una resistencia de intensidad moderada, por lo que se recomienda efectuar la valoración a la concentración 10x.



- Una mortalidad de entre el 98% y el 100% a la concentración 10x confirma la presencia de una resistencia de intensidad moderada.
- Una mortalidad (corregida, cuando proceda) inferior al 98% a la concentración 10x es indicativa de una resistencia de alta intensidad.

Cuando se confirme la presencia de resistencia a las concentraciones 5x, y especialmente 10x, es probable que el insecticida este presentando fallas de control en campo. Por ello será **IMPERATIVO** adoptar medidas urgentes de manejo de la resistencia (5) para preservar la eficacia de los insecticidas empleados en el control de los vectores del paludismo. Además, se deberá estudiar la distribución de la resistencia para determinar dónde se expresa con mayor intensidad y dónde habría que priorizar la aplicación de medidas adicionales de control cuando así se infiera también de los datos epidemiológicos.

Los criterios de clasificación recomendados (secciones 3.6.1 y 3.6.2) se basan en la escasa probabilidad de que una supervivencia superior al 2% se deba únicamente a la casualidad, siempre y cuando se hayan cumplido todas las condiciones experimentales.

Conviene ser prudente al interpretar los resultados de una sola prueba, sobre todo cuando se hayan utilizado hembras capturadas en campo, pues las técnicas de muestreo pueden influir en los resultados. Los insectos capturados en interiores, por ejemplo, pueden mostrar un sesgo en favor de individuos que ya hayan estado expuestos a los insecticidas y hayan sobrevivido (es decir, la muestra puede incluir ejemplares con mayor probabilidad de ser resistentes). Las muestras que contengan una mezcla de especies también pueden dar resultados no concluyentes o engañosos, porque la frecuencia de los genes de resistencia probablemente varíe de una especie a otra. Es importante, por consiguiente, determinar la especie de los insectos analizados y calcular la tasa de susceptibilidad de cada especie por separado.

## 3.7 Material y suministros

### 3.7.1 Procurement

La Unidad de Investigación de Lucha Antivectorial (Vector Control Research Unit) de la Universiti Sains Malaysia de Penang (Malasia), en coordinación con la OMS, prepara los kits de prueba y los papeles impregnados de insecticida. En el sitio web del WHOPES se especifican los procedimientos y condiciones más recientes para la compra de los kits, así como de los papeles impregnados y demás material necesario.<sup>4</sup> También es posible comprar por separado cada uno de los artículos que integran el kit, incluidos los papeles impregnados, utilizando el formulario de pedido que figura en el sitio web o a través del portal en línea.<sup>5</sup> El kit incluye asimismo instrucciones completas para efectuar la prueba de susceptibilidad, así como varios ejemplares de los formularios para el registro de los datos (véanse los anexos 1 y 2).

---

4 <http://www.who.int/whopes/resistance/en/> - en inglés

5 <http://www.inreskit.usm.my> - en inglés



### 3.7.2 Composición del kit de prueba de la OMS

A continuación se detalla la composición del kit de prueba de la OMS, aunque también cabe encargar por separado tubos y clips metálicos adicionales:

- Doce 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:
  - cuatro tubos marcados con un punto **rojo** que servirán de tubos de exposición (esto es, para exponer a los mosquitos al papel impregnado de insecticida);
  - dos tubos marcados con un punto **amarillo** que servirán de tubos de control sin insecticida (esto es, para exponer a los mosquitos al papel de control, tratado solo con aceite);
  - seis tubos marcados con un punto **verde** que servirán de tubos de mantenimiento en los que mantener a los mosquitos antes de la exposición y después de ella; y
  - seis unidades corredizas, cada una de ellas con tapón de rosca en ambos lados y un orificio de llenado de 15 mm de diámetro.
- Cuarenta hojas de papel blanco limpio (12 × 15 cm) con las que forrar los tubos de mantenimiento.
- Doce clips metálicos (seis de acero y seis de cobre) para mantener el papel fijado a la pared de los tubos: los seis clips de acero se utilizan con los seis tubos de mantenimiento (punto verde), y los seis clips de cobre con los cuatro tubos de exposición (punto rojo) y los dos tubos de control (punto amarillo).
- Dos tubos aspiradores de vidrio de 12 mm de diámetro interno, junto con una manguera de goma de 60 cm de longitud y dos boquillas.
- Un rollo de cinta adhesiva.
- Una hoja de instrucciones.
- Un formulario de reporte.
- Una hoja de papel logarítmico.
- Una etiqueta.

### 3.7.3 Papeles impregnados de insecticida y sinergista

El surtido de papeles de ensayo impregnados de insecticida ha sido ampliado para incluir en él nuevos principios activos, así como concentraciones más elevadas de piretroides, pirimifos metil y bendiocarb (para determinar la intensidad de la resistencia) y butóxido de piperonilo (PBO por sus siglas en Inglés) al 4% (véase el cuadro 3.1). Los papeles impregnados de insecticida vienen empacados en cajas de plástico, cada una de las cuales contiene ocho hojas.

Se recomienda al usuario que consulte regularmente el sitio web del WHOPES<sup>6</sup> para obtener información actualizada sobre los papeles de ensayo y demás material que se ofrece. A través del portal en línea de la Universiti Sains Malaysia se pueden

---

6 <http://www.who.int/whopes>

encargar papeles impregnados de insecticida a concentraciones seriadas, en particular las concentraciones 5x y 10x (indicadas en el cuadro 3.1).<sup>7</sup> Los papeles con concentraciones 5x y 10x están destinados a aquellas situaciones en que sea necesario determinar la intensidad con que se expresa la resistencia a un determinado insecticida en una especie o población de mosquitos.

---

<sup>7</sup> <http://www.inreskit.usm.my>



## 4. ANÁLISIS COMPLEMENTARIOS: PRUEBA CON SINERGISTA E INSECTICIDA PARA INFERIR MECANISMOS DE RESISTENCIA METABÓLICA

### 4.1 Uso de sinergistas en las pruebas de susceptibilidad a los insecticidas

Al igual que la prueba OMS de susceptibilidad, la prueba con sinergista e insecticida es una técnica que mide directamente la respuesta a la exposición, y más concretamente el efecto de la exposición previa a un sinergista sobre la expresión de la resistencia a un insecticida. Un sinergista no es un compuesto insecticida, pero ciertas enzimas desintoxicantes de los mosquitos lo reconocen como sustrato. Esta prueba se utiliza para determinar la intervención de mecanismos metabólicos en la aparición de fenotipos de resistencia. En el recuadro 4.1 se resume el procedimiento de prueba. Todos los aspectos relativos a las condiciones de prueba (incluidas las condiciones ambientales) quedan expuestos en la sección 3.4.

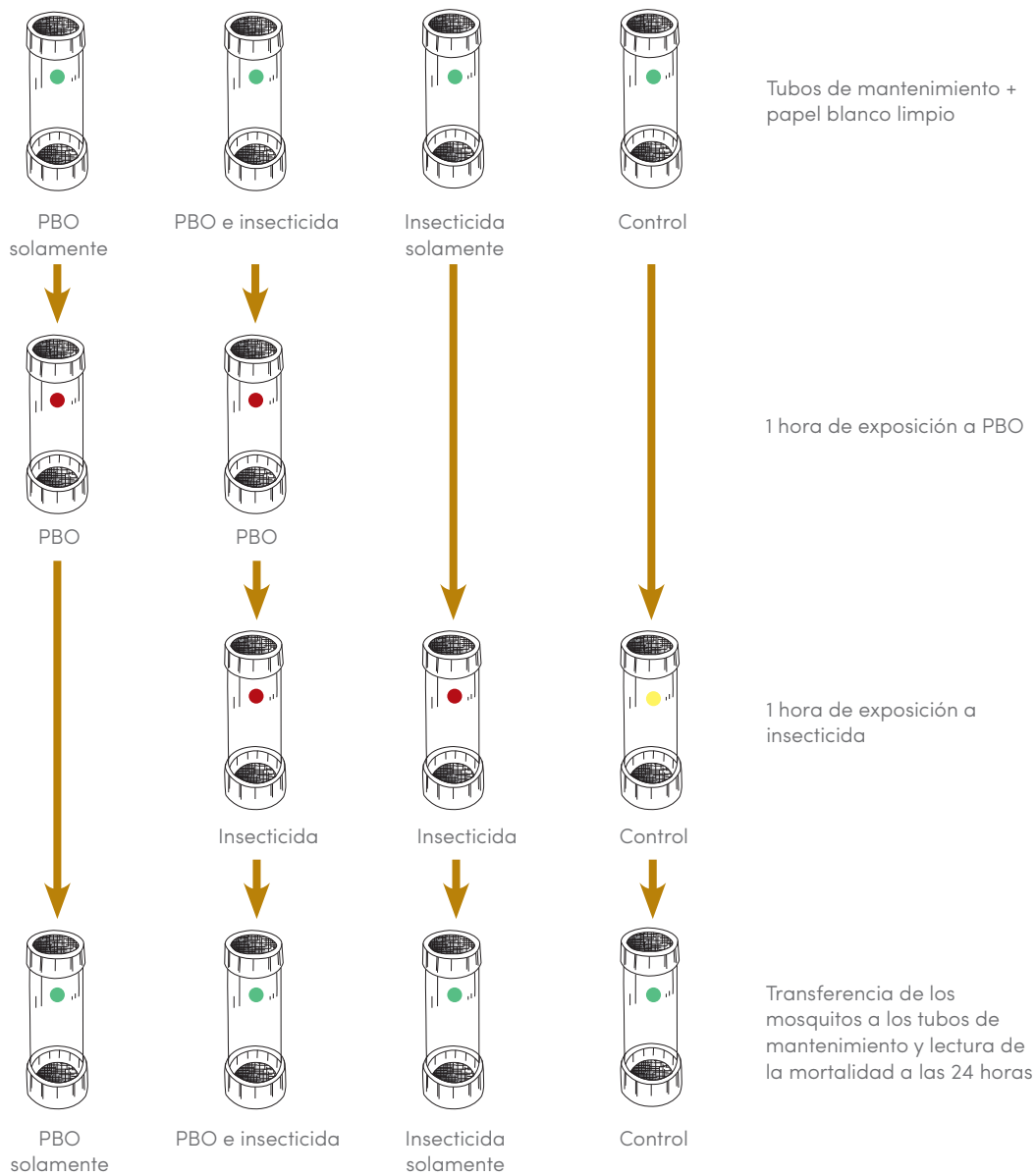
Disponemos de sinergistas para ciertos grupos de enzimas de desintoxicación metabólica como las esterasas, las oxidasas y las glutatión S-transferasas. El PBO, por ejemplo, puede actuar en sinergia con los efectos de insecticidas piretroides reduciendo o anulando la capacidad desintoxicante de ciertas enzimas, principalmente las monooxigenasas. En este caso, de la atenuación o completa supresión de la expresión de un fenotipo resistente se infiere que el principal responsable de la resistencia, en ausencia de PBO, es un sistema de desintoxicación dependiente de monooxigenasas. Hay otros compuestos sinergistas que todavía no están validados suficientemente para emplearlos en este tipo de pruebas de sinergista e insecticida.

#### RECUARDO 4.1.

#### **MEDICIÓN DEL EFECTO DE LA EXPOSICIÓN PREVIA AL SINERGISTA PBO SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA RESISTENCIA A UN INSECTICIDA EN MOSQUITOS ADULTOS: PROCEDIMIENTO DE PRUEBA**

1. Este experimento consiste en efectuar una prueba con cuatro exposiciones distintas: PBO solamente; insecticida solamente; PBO seguido de insecticida; y un control con disolvente.
2. Para las pruebas se emplean los tubos de la prueba OMS y se aplican las técnicas de transferencia descritas en el recuadro 3.1.
3. Se introducen hojas de papel blanco limpio (12 × 15 cm), enrolladas en forma de cilindro, en cuatro tubos de mantenimiento (con el punto verde), una por tubo, sujetándolas con un clip de alambre de acero para mantenerlas en posición. Después se fijan los tubos a las láminas corredizas, cuidando de que todos ellos estén debidamente etiquetados.
4. Siguiendo el mismo procedimiento se preparan cinco tubos de exposición (cuatro con punto rojo y uno con punto amarillo). Se forran dos tubos de exposición marcados de rojo con una hoja de papel impregnado de insecticida (concentración discriminante de insecticida). Los otros dos tubos marcados de rojo se forran con sendos papeles impregnados de PBO al 4%. El tubo de control de exposición (punto amarillo) se forra con papel impregnado de aceite. Después se mantiene cada papel en su posición fijándolo con un clip de alambre de cobre, cuidando de etiquetar debidamente todos los tubos.

- 
5. De la muestra de mosquitos por analizar se seleccionan al menos 100 hembras adultas.
  6. Se divide la muestra en cuatro grupos de 20 a 25 ejemplares y después se introduce cada grupo, por aspiración, en cada uno de los cuatro tubos de mantenimiento.
  7. Los mosquitos que se van a someter a "PBO solamente" y a "PBO seguido de insecticida" son transferidos a los dos tubos de exposición con PBO al 4%. Tras 1 hora de exposición, se registra la mortalidad (en principio al cabo de 1 hora no debería haber mortalidad). Las demás muestras ("insecticida solamente" y "control con disolvente") se dejan en sus respectivos tubos de mantenimiento.
  8. Se devuelven a su tubo de mantenimiento los mosquitos expuestos a "PBO solamente".
  9. Los mosquitos que se van a someter a "insecticida solamente" y a "PBO seguido de insecticida" son transferidos simultáneamente a los dos tubos de exposición con insecticida y se exponen durante 1 hora. Al mismo tiempo, los mosquitos de "control con disolvente" son transferidos al tubo de control con papel impregnado de aceite y se exponen durante 1 hora.
  10. Tras 1 hora de exposición se devuelven a sus respectivos tubos de mantenimiento las tres muestras de mosquitos ("solamente insecticida", "PBO seguido de insecticida" y "control con disolvente") y se registra la mortalidad. En el extremo mallado de cada uno de los cuatro tubos de mantenimiento se coloca una almohadilla de algodón empapada de agua azucarada.
  11. Se dejan los mosquitos en los tubos de mantenimiento durante 24 horas (periodo de recuperación). Durante este tiempo, es importante que los tubos de mantenimiento estén en un lugar sombreado y protegido, a salvo de temperaturas extremas (lo ideal es un insectario). Hay que registrar la temperatura y la humedad relativa reinantes durante el periodo de recuperación.
  12. Al término del periodo de recuperación (es decir, 24 horas después de la exposición), se cuenta y anota el número de mosquitos muertos (según las definiciones indicadas en el recuadro 3.1) que hay en cada tubo.
  13. Este proceso debe ser repetido tres veces. En la figura 4.1 está representado esquemáticamente.
-



PBO: butóxido de piperonilo (PBO por sus siglas en Inglés)

FIG. 4.1  
**Pasos para realizar la prueba con sinergista e insecticida**



## 4.2 Registro y presentación de los resultados de la prueba con sinergista e insecticida

### 4.2.1 Medida de la mortalidad

Transcurridas 24 horas desde la exposición se determina la mortalidad (esto es, se cuenta el número de mosquitos muertos en los tubos de exposición y en los de control). Si 24 horas después de la exposición un mosquito aún es capaz de volar, debe ser considerado "vivo". Sin embargo, si se encuentra "derribado" (es decir, moribundo), se considerará que está muerto. Ello se justifica por el hecho de que, en el campo, un mosquito que esté en tales condiciones será probablemente capturado y devorado por un predador o por hormigas.

La mortalidad de los mosquitos expuestos al insecticida y de los controles se calcula sumando el número de mosquitos muertos y expresándolo como porcentaje del número total de mosquitos expuestos:

$$\text{Mortalidad observada} = \frac{\text{Total de mosquitos muertos}}{\text{Tamaño total muestra}} \times 100$$

Cuando la mortalidad de los controles sea  $\geq 20\%$ , las pruebas deberán ser desechadas. Cuando sea  $< 20\%$ , se deberá corregir la mortalidad observada en los expuestos a "insecticida solamente" y a "PBO seguido de insecticida" aplicando la fórmula de Abbott como sigue:

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

Al presentar los recuentos de mortalidad siempre debe indicarse el tamaño de la muestra.

Cuando la mortalidad de la muestra expuesta a "PBO solamente" sea  $> 10\%$  (esto es, dos o más mosquitos muertos por tubo), habrá que desechar la totalidad de la prueba porque los papeles con sinergista estarían causando de por sí un nivel significativo de mortalidad.

### 4.2.2 Comparación entre las muestras expuestas a sinergista y las no expuestas

Una vez efectuadas las correcciones de la mortalidad en los expuestos en función de la mortalidad observada en los controles, es posible comparar la mortalidad presente en la muestra expuesta a "PBO seguido de insecticida" con la registrada en las muestras donde no ha habido efecto sinergista esto es, las expuestas a "insecticida solamente".



### 4.3 Interpretación de los resultados de las pruebas con sinergista e insecticida

Las recomendaciones que rigen actualmente son las siguientes.

- Cuando la mortalidad media en las muestras expuestas a “insecticida solamente” sea  $\geq 90\%$ , no será posible evaluar con fiabilidad el efecto del PBO.
- Cuando la mortalidad media en las muestras expuestas a “insecticida solamente” sea  $< 90\%$ , se puede interpretar el efecto del PBO según los siguientes criterios:
  - una completa restauración de la susceptibilidad (mitigación de la resistencia) por exposición previa a PBO (esto es, mortalidad media  $\geq 98\%$  en las muestras de “PBO seguido de insecticida”) significa que la expresión del fenotipo resistente en la población analizada se debe por completo a un mecanismo de resistencia dependiente de una monooxigenasa;
  - cuando se observe una restauración parcial de la susceptibilidad por exposición previa a PBO (esto es, cuando la mortalidad media en las muestras de “PBO seguido de insecticida” sea mayor que la mortalidad media en las muestras de “insecticida solamente” pero inferior al 98%), ello significará que la expresión del fenotipo resistente se debe solo parcialmente a un mecanismo de resistencia dependiente de una monooxigenasa y que seguramente hay otros mecanismos de resistencia presentes en la población analizada;
  - la ausencia de restauración de la susceptibilidad por exposición previa a PBO (esto es, mortalidad media en las muestras de “PBO seguido de insecticida” igual o inferior a la mortalidad media en las muestras de “insecticida solamente”) pone de manifiesto que el fenotipo de resistencia detectado no se debe a un proceso de desintoxicación mediado por una monooxigenasa.

### 4.4 Material y suministros

En representación de la OMS, la Universiti Sains Malaysia prepara kits de prueba, papeles impregnados de insecticida y papeles impregnados de PBO al 4%, como queda explicado (véase la sección 3.7).

El kit incluye asimismo varios ejemplares del formulario de registro de datos recomendado (reproducido también en el anexo 3).



## 5. PRUEBA DE LA BOTELLA DE LOS CDC PARA MOSQUITOS ADULTOS

En 2010 los CDC publicaron una detallada descripción, incluidas las pautas metodológicas, de su técnica de prueba en botella (16), publicación que actualizan periódicamente desde su sitio web, en el que ofrecen material complementario como el protocolo de prueba para determinar la intensidad de la resistencia o un vídeo pedagógico sobre las propias directrices,<sup>8</sup> de las que también existe una versión imprimible e ilustrada con fotografías (25).

### 5.1 Prueba de la botella con tiempos de exposición y concentraciones discriminantes

La prueba de la botella de los CDC ofrece un método complementario para detectar la resistencia a los insecticidas en poblaciones de vectores de paludismo. Su uso está muy extendido con fines de vigilancia regular de la resistencia en poblaciones de mosquitos. Mientras que con la prueba de la OMS se observa la tasa de mortalidad registrada en mosquitos expuestos a una concentración discriminante de insecticida durante un tiempo determinado, con la prueba de la botella de los CDC se mide el lapso de tiempo discriminante que se requiere para incapacitar a mosquitos susceptibles empleando una concentración predeterminada de insecticida.

Como ocurre con la prueba de la OMS, el ensayo de la botella de los CDC puede ser aplicado a hembras adultas capturadas en campo o criadas en insectario a partir de colecciones de larvas. La prueba de la botella también ha sido normalizada: empleando poblaciones de susceptibilidad conocida, se han determinado tiempos de exposición y concentraciones discriminantes para cada insecticida y cada especie de vector. Es posible por lo tanto efectuar la prueba únicamente con la concentración y el tiempo discriminantes (Cuadro 5.1). La técnica consiste en registrar el número de mosquitos incapacitados o derribados después del tiempo de exposición discriminante (esto es, el tiempo necesario para incapacitar con seguridad al 100% de la población original sometida a prueba).

### 5.2 Prueba de la botella a concentraciones crecientes para determinar la intensidad

Recientemente se ha perfeccionado la técnica de la prueba de la botella agregándole la posibilidad de determinar la intensidad de la resistencia con el mismo formato de ensayo. Empleando una serie de múltiplos de la concentración discriminante (1x, 2x, 5x y 10x) se obtiene una información similar a la del cálculo de los grados de resistencia. Sin embargo, con el uso de múltiples concentraciones es posible obtener información útil con menos mosquitos, lo que hace de este método una técnica rápida para valorar si la resistencia puede estar causando fallas en el control de vectores. El hecho de que los mosquitos sobrevivan a un múltiplo elevado de la concentración discriminante de insecticida alertará al equipo de vigilancia y lo llevará a prestar atención a la zona donde la resistencia pueda estar comprometiendo la eficacia de las intervenciones de control vectorial y sea necesario por lo tanto realizar análisis complementarios.

---

8 [http://www.cdc.gov/parasites/education\\_training/lab/bottlebioassay.html](http://www.cdc.gov/parasites/education_training/lab/bottlebioassay.html)



### 5.3 Ventajas e inconvenientes de la prueba de la botella

Cuando se utilice la prueba de la botella de los CDC con fines de vigilancia sistemática de la susceptibilidad a los insecticidas, conviene tener en cuenta las siguientes condiciones:

- es preciso seguir estrictamente los procedimientos indicados en las directrices de los CDC, en particular los relativos al uso de los disolventes de insecticida recomendados (etanol o acetona), así como los protocolos de tratamiento de los frascos;
- es preciso respetar los tiempos de exposición y concentraciones de insecticida indicados (Cuadro 5.1); y
- es preciso observar estrictamente los tiempos de conservación y procedimientos de lavado de las botellas.

Entre las ventajas de utilizar el método de prueba de la botella de los CDC se destacan las siguientes:

- cuando el usuario opte por preparar sus propias botellas, puede evitarse el uso de kits de prueba y papeles impregnados “prefabricados”, lo que le ofrece más flexibilidad en cuanto a los tipos y concentraciones de insecticida que le es posible evaluar;
- el manual incluye un protocolo para utilizar insecticidas formulados en el análisis de la prueba, aunque ello exige del usuario una cuidadosa interpretación de los resultados;
- el procedimiento es relativamente rápido y sencillo (p.ej., no se requiere un periodo de espera de 24 horas o más); y
- el procedimiento admite la realización de la prueba con diversos sinergistas.

Entre los inconvenientes de utilizar el método de la botella de los CDC cabe señalar los siguientes:

- la existencia de posibles problemas por lo que respecta al control del proceso: aunque el usuario final tiene la responsabilidad de preparar correctamente las botellas, es posible, por ejemplo, que haya diferencias en el modo en que distintos laboratorios preparan y realizan los procedimientos con las botellas antes y después de la realización de las pruebas;
- el imperativo que los entomólogos lleven puesto equipo protector al impregnar las botellas;
- la necesidad de transportar las botellas de vidrio al campo, a veces durante largos periodos de tiempo cuando no se tiene acceso a un laboratorio;
- el requisito de transferir los mosquitos a una jaula limpia antes de separar a los muertos de los vivos para después determinar la especie y estudiar los mecanismos de resistencia; y

- el imperativo limpiar muy bien todas las botellas entre cada utilización: es esencial realizar controles aleatorios de las botellas lavadas empleando mosquitos susceptibles.

Tanto el método de la OMS como el de los CDC permiten detectar con fiabilidad una resistencia cuando está presente. Sin embargo, aunque ambas técnicas proporcionan datos en forma de porcentajes de mortalidad o de tiempo necesario para incapacitar a los mosquitos, los resultados obtenidos con la prueba de la botella de los CDC NO son directamente comparables con los de la prueba OMS de susceptibilidad en tubo, porque el método CDC se basa en la proporción de mosquitos incapacitados y la prueba de la OMS mide la mortalidad.

CUADRO 5.1.

**Prueba de la botella de los CDC - Concentraciones discriminantes de insecticida y tiempos discriminantes (en minutos) para mosquitos *Anopheles* y *Aedes***

INSECTICIDA	CONCENTRACIÓN DE INSECTICIDA POR ESPECIE (MICROGRAMOS DE INGREDIENTE ACTIVO POR BOTELLA WHEATON DE 250 ML)		TIEMPO DISCRIMINANTE (MINUTOS)
	ANOPHELES	AEDES	
Bendiocarb	12,5	12,5	30
Ciflutrina	12,5	10	30
Cipermetrina	12,5	10	30
Deltametrina	12,5	10	30
Lambdacihalotrina	12,5	10	30
Permetrina	21,5	15	30
DD T	100	75	45
Malatión	50	50	30
Fenitrotión	50	50	30
Pirimifos metil	20	-	30

DDT: diclorodifeniltricloroetano

## 6. ANÁLISIS COMPLEMENTARIOS EN LABORATORIO: DETERMINACIÓN DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA



Como queda explicado en la sección 4, si después de utilizar las concentraciones discriminantes se encuentran supervivientes (>2%), puede ser útil efectuar nuevas pruebas para determinar los mecanismos genéticos responsables de la resistencia observada. Este tipo de información será seguramente útil para planificar el control vectorial a más largo plazo, pues ayuda a evaluar la probabilidad de resistencia cruzada entre compuestos de una u otra clase de insecticidas y a la vez proporciona información de interés sobre el potencial de propagación de la resistencia dentro de las poblaciones de vectores. Digamos por ejemplo que en una determinada población de vectores se halla la presencia de mutaciones *kdr* (que confieren resistencia a los piretroides). En tal caso, es probable que esa población también sea resistente al DDT.

A medida que se han ido entendiendo mejor los mecanismos de resistencia a los insecticidas en los mosquitos y otros insectos vectores, se ha progresado sustancialmente en la elaboración de nuevas pruebas para detectar dichos mecanismos. Hace ya decenios que disponemos de un conjunto de técnicas de ensayo bioquímico y enzimático que sirven para detectar la presencia de mecanismos de resistencia metabólica. Ahora hay varios ensayos moleculares que complementan esas técnicas y pueden utilizarse para detectar experimentalmente mutaciones que alteran el sitio diana de un insecticida (p.ej. el *kdr* en el caso de piretroides y DDT; la *Ace-1* en el de organofosforados y carbamatos; o la *rdl* en el del fipronil o el dieldrín) y también, cada vez más, mecanismos de resistencia metabólica (p.ej. glutatión S-transferasas). En aquellos lugares donde escaseen los recursos o las instalaciones convendrá solicitar la ayuda de otras instituciones para el análisis de muestras representativas. De forma similar, por lo que respecta a la preservación de muestras y ejemplares también es preferible pedir asesoramiento a una institución colaboradora.

La exposición detallada de las técnicas y métodos recomendados de análisis bioquímico y molecular trasciende el alcance de las presentes directrices. Para obtener este tipo de información se aconseja al lector que consulte otras fuentes, tales como *Methods in Anopheles research manual* (25) u otras publicaciones (27).

## 7. MANEJO Y UTILIZACIÓN DE LOS DATOS

En condiciones ideales, los datos conforman las bases de las acciones en salud pública. La gestión eficaz, el intercambio rápido y la valoración puntual de los datos son factores cruciales para alimentar la elaboración y aplicación de estrategias de lucha contra los vectores de paludismo. Además de los datos epidemiológicos y demás tipos de datos disponibles, la información obtenida gracias a la vigilancia de la resistencia a los insecticidas es un componente básico de todo proceso de decisión sobre las intervenciones con insecticidas.

### 7.1 Manejo y reporte de datos

La responsabilidad de obtener, reunir, analizar y reportar datos, así como de controlar su calidad, reside en última instancia en los programas nacionales de lucha contra las enfermedades transmitidas por vectores. Ello asegura que los recursos disponibles se destinen eficazmente a generar la información necesaria para orientar la oportuna toma de decisiones.

Cuando un país no cuente con una base de datos nacional con información entomológica que incluya datos de resistencia a los insecticidas, deberá dotarse de ella. También conviene estudiar sus posibles nexos con sistemas de manejo de datos ya existentes (p.ej. un sistema de información de salud o de gestión sanitaria). Cuando el programa nacional de lucha antipalúdica disponga de escasa capacidad, puede haber otra institución, por ejemplo un centro de investigación, que asuma la función de manejo de datos en representación del programa. Es preciso que los procedimientos de reporte, manejo y presentación de datos estén bien documentados y que el proceso y la frecuencia con que se hayan de transmitir los datos al programa nacional de lucha antipalúdica, así como el formato de esos datos, estén claramente definidos entre las instituciones colaboradoras.

Es preciso alentar a cuantas partes intervengan en la obtención de datos entomológicos de interés a que transmitan puntualmente esa información para incorporarla a la base de datos nacional. La existencia de plantillas normalizadas y adaptadas a la estructura de la base de datos nacional agilizará el proceso de recopilación de los datos y asegurará su adecuada comunicación. Lo ideal es que los resultados de toda prueba relativa a la susceptibilidad a los insecticidas y sus mecanismos lleguen a manos del programa nacional de lucha antipalúdica dentro de los tres meses siguientes a su obtención.

Los datos de las pruebas, incluidas las de la intensidad de la resistencia, cuando las haya, y de todo ensayo tocante a los mecanismos de resistencia también deben ser transmitidos a la OMS para que esta los incluya en la base mundial de datos agregados instituida en 2014. Esta base, que se alimenta de bases de datos regionales, contiene información facilitada anualmente por los programas nacionales de lucha antipalúdica, así como datos extraídos de publicaciones y redes regionales. A fin de facilitar el proceso de envío de datos a la OMS existe una plantilla normalizada de datos sobre resistencia a los insecticidas. Toda esta información será después valorada para entender mejor la situación tanto mundial como por regiones en lo que respecta a la resistencia a insecticidas, lo que sirve a su vez para orientar las políticas de vigilancia y de lucha antivectorial, en la línea marcada por el Plan mundial.

En lo esencial, las bases de datos mundiales solo resultan útiles si los países con paludismo endémico obtienen y comunican la información. De ahí la gran importancia de la calidad de los datos y de su reporte de forma íntegra y oportuna dentro de cada país.

## 7.2 Uso de los datos para la toma de decisiones

La toma de decisiones sobre el control vectorial debe estar basada en el análisis y evaluación periódica de los datos nacionales de vigilancia de la resistencia a los insecticidas que debe realizar un grupo de especialistas en cada país. Dado que el mandato y la responsabilidad de combatir a los vectores del paludismo a escala nacional recae en el programa nacional de lucha antipalúdica, a él corresponde también dirigir la creación y el funcionamiento de este grupo técnico, que deberá coordinar las actividades nacionales de vigilancia y manejo de la resistencia a los insecticidas con objeto de asegurar la adecuada jerarquización de prioridades y la debida utilización de los recursos y de ofrecer un mecanismo decisorio eficaz.

El programa nacional de lucha antipalúdica debe definir la composición idónea del grupo técnico. En el proceso de determinar qué personas e instituciones van a participar en el órgano decisorio nacional o pueden aportar datos (p.ej. sobre susceptibilidad a los insecticidas) o recursos útiles para apoyar la adopción de decisiones, el primer paso consiste en hacer una relación de todos los posibles colaboradores. Es imperativo comprometer a los colaboradores para que participen en este proceso, de modo que todo cambio en la política de lucha antivectorial o los planes de gestión y vigilancia de la resistencia a los insecticidas responda a la situación real y actual y pueda ser financiado y aplicado eficazmente. Se recomienda instituir una robusta participación intersectorial, con presencia de representantes de los ministerios de salud, agricultura y medio ambiente y especialistas de la OMS y establecimientos universitarios, así como de otros colaboradores pertinentes, como donantes u organizaciones no gubernamentales. La participación del organismo nacional de reglamentación es fundamental para seleccionar con conocimiento de causa intervenciones con insecticidas adecuados.

Para una instancia decisoria la prioridad estriba pues en examinar la estrategia y las praxis vigentes de lucha antivectorial a la luz de todas las novedades técnicas que surjan en relación con la resistencia a los insecticidas y, a partir de ahí, introducir los ajustes adecuados para lograr la mayor coherencia con el Plan mundial y las directrices subsiguientes de la OMS. En el Plan mundial (5) se ofrecen más indicaciones y ejemplos sobre la estructura del órgano técnico y decisorio. También resulta ilustrativo, en este sentido, el proceso documentado que se ha llevado adelante en Zambia de planificación operativa para el manejo de la resistencia a los insecticidas (28).



## 8. RECOMENDACIONES ADICIONALES

Conviene mencionar por último una serie de recomendaciones generales sobre la vigilancia de la resistencia a los insecticidas.

- Como parte de la ejecución del Plan mundial (5), los programas de lucha contra el paludismo u otras enfermedades transmitidas por vectores deberían elaborar planes de manejo de la resistencia a los insecticidas en los que se especifiquen las intervenciones prioritarias, los sitios “centinela” seleccionados y la frecuencia de las actividades de vigilancia de los vectores y su susceptibilidad a los insecticidas. Dichos planes deberían prever mecanismos de manejo de los datos con los que fundamentar las decisiones programáticas.
- Para que los programas de vigilancia de las resistencias sean eficaces deben contar con personal debidamente formado y con una infraestructura suficiente. En gran parte de los países esta es todavía la principal dificultad, a la que tratan de dar respuesta buen número de instituciones y colaboradores operativos. Es conveniente evaluar frecuentemente las necesidades de formación en los países y darles respuesta.
- De unos años a esta parte han surgido una serie de pruebas basadas en técnicas moleculares de PCR de alto rendimiento que actualmente se utilizan para detectar la presencia de mutaciones *kdr*. Estos métodos han servido, por ejemplo, para vigilar la frecuencia de mutaciones *kdr* en *An. gambiae* en zonas occidentales de África como indicación indirecta de la presencia de resistencia al DDT o a los piretroides. No se trata, empero, de un procedimiento que en general se recomiende seguir: es preciso que las pruebas moleculares se acompañen siempre de la prueba OMS de susceptibilidad (o la prueba de botella de los CDC). Por supuesto, siempre es interesante conocer los mecanismos que intervienen en una resistencia porque a partir de ahí cabe inferir una posible resistencia cruzada entre clases de insecticidas y emplear después pruebas para detectar fenotipos resistentes. Este tipo de información es útil para concebir estrategias de manejo de la resistencia y evaluar su éxito o fracaso.
- Cuando existan laboratorios adecuados, es posible establecer vínculos entre los datos de resistencia a los insecticidas y los relativos a las infecciones parasitarias en los mosquitos, sometiendo a pruebas de detección de esporozoítos a los mismos mosquitos adultos de campo utilizados para las pruebas. Aquellos ejemplares que den resultado positivo a un primer ensayo inmunoenzimático (ELISA) deben ser sometidos a un segundo ensayo de confirmación, ya sea un ELISA con tratamiento previo por calor (29) o una PCR. Ello tiene importancia por lo que respecta a los efectos de la resistencia en la transmisión del paludismo.
- En el caso de nuevos insecticidas que no actúen principalmente induciendo efectos letales, sino alterando la fisiología del insecto (p.ej., modificando el comportamiento hematófago o reduciendo la fecundidad o la fertilidad), será preciso elaborar otros procedimientos experimentales para detectar posible resistencia.

- Cuando se disponga de pocos ejemplares, conviene proceder estratégicamente, sometiendo a prueba un solo piretroide de clase 1 (como la permetrina) y un solo piretroide de clase 2 (como la deltametrina), lo que en principio debería bastar. El programa de lucha antivectorial puede prever que en un primer momento solo se realicen pruebas de resistencia a la permetrina y la deltametrina (de entre los piretroides), el bendiocarb (de entre los carbamatos), el malatión o el pirimifos metil (de entre los organofosforados) y el DDT (de entre los organoclorados).





## REFERENCIAS

1. WHO. World malaria report 2015. Geneva: World Health Organization; 2015 (<http://who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>, accessed 12 September 2016).
2. WHO. Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance (6th edition). Geneva: World Health Organization; 2006 ([http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69795/1/WHO\\_CDS\\_NTD\\_WHOPEP\\_GCDPP\\_2006.1\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69795/1/WHO_CDS_NTD_WHOPEP_GCDPP_2006.1_eng.pdf), accessed 12 September 2016).
3. Hemingway J. Malaria: fifteen years of interventions. *Nature*. 2015;526(7572):198–199.
4. Mnzava AP, Knox TB, Temu EA, Trett A, Fornadel C, Hemingway J et al. Implementation of the global plan for insecticide resistance management in malaria vectors: progress, challenges and the way forward. *Malar J*. 2015;14(1):173.
5. WHO. Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors (GPIRM). Geneva: World Health Organization; 2012 (<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/gpirm/en/>, accessed 12 September 2016).
6. WHO. The technical basis for coordinated action against insecticide resistance: preserving the effectiveness of modern malaria vector control: meeting report. Geneva: World Health Organization; 2011 ([http://www.who.int/malaria/publications/atoz/coordinated\\_action\\_against\\_irs\\_resistance.pdf](http://www.who.int/malaria/publications/atoz/coordinated_action_against_irs_resistance.pdf), accessed 12 September 2016).
7. WHO. Criteria and meaning of tests for determining the susceptibility or resistance in insects to insecticides. Geneva: World Health Organization; 1981.
8. WHO. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva: World Health Organization; 1981.
9. WHO. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. Geneva: World Health Organization; 2013 (<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241505154/en/>, accessed 12 September 2016).
10. WHO. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. Geneva: World Health Organization; 1998 ([http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who\\_cds\\_cpc\\_mal\\_98\\_12/en/](http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_cds_cpc_mal_98_12/en/), accessed 12 September 2016).
11. Strobe C, Donegan S, Garner P, Enayati AA, Hemingway J. The impact of pyrethroid resistance on the efficacy of insecticide-treated bed nets against African anopheline mosquitoes: systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 2014;11(3):e1001619.
12. Ranson H, Lissenden N. Insecticide resistance in African *Anopheles* mosquitoes: a worsening situation that needs urgent action to maintain malaria control. *Trends Parasitol*. 2016;32(3):187–196.
13. Coetzee M, Kruger P, Hunt RH, Durrheim DN, Urbach J, Hansford CF. Malaria in South Africa: 110 years of learning to control the disease. *S Afr Med J*. 2013;103(10 Pt 2):770–778.
14. WHO. Insecticide resistance and vector control: tenth report of the Expert Committee on Insecticides. Geneva: World Health Organization 1960 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13858457>, accessed 12 September 2016).
15. WHO. Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides - diagnostic test. Geneva: World Health Organization; 1981.



16. CDC. Guideline for evaluating insecticide resistance in arthropod vectors using the CDC bottle bioassay. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 2010 ([http://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/fsp/ir\\_manual/ir\\_cdc\\_bioassay\\_en.pdf](http://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/fsp/ir_manual/ir_cdc_bioassay_en.pdf), accessed 15 September 2016).
17. WHO. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Geneva: World Health Organization; 2005 ([http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO\\_CDS\\_WHOPES\\_GCDPP\\_2005.13.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf), accessed 12 September 2016).
18. WHO. Resistance of vectors and reservoirs of diseases to pesticides: twenty-second report of the WHO Expert Committee on Insecticides. Geneva: World Health Organization; 1976 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/817518>, accessed 12 September 2016).
19. WHO. Vector resistance to pesticides: fifteenth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. Geneva: World Health Organization; 1992 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1574907>, accessed 12 September 2016).
20. 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.
21. Ahoua Alou LP, Koffi AA, Adja MA, Tia E, Kouassi PK, Kone M et al. Distribution of *ace-1R* and resistance to carbamates and organophosphates in *Anopheles gambiae* s.s. populations from Cote d'Ivoire. *Malar J.* 2010;9(1):167 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20553593>, accessed 12 September 2016).
22. Kolaczinski J, Curtis C. Laboratory evaluation of fipronil, a phenylpyrazole insecticide, against adult *Anopheles* (Diptera: Culicidae) and investigation of its possible cross-resistance with dieldrin in *Anopheles stephensi*. *Pest Manag Sci.* 2001;57(1):41–45.
23. Brooke BD, Hunt RH, Coetzee M. Resistance to dieldrin + fipronil assort with chromosome inversion 2La in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Med Vet Entomol.* 2000;14(2):190–194.
24. Lines JD, Nassor NS. DDT resistance in *Anopheles gambiae* declines with mosquito age. *Med Vet Entomol.* 1991;5(3):261–265.
25. MR4. Methods in *Anopheles* research manual. Malaria Research and Reference Reagent Resource Centre; 2014 (<https://www.beiresources.org/Portals/2/PDFS/2014MethodsInAnophelesResearchManualFullVersionv2tso.pdf>, accessed 12 September 2016).
26. Glunt KD, Paaijmans KP, Read AF, Thomas MB. Environmental temperatures significantly change the impact of insecticides measured using WHOPES protocols. *Malar J.* 2014;13(1):350.
27. Donnelly MJ, Isaacs AT, Weetman D. Identification, validation, and application of molecular diagnostics for insecticide resistance in malaria vectors. *Trends Parasitol.* 2016;32(3):197–206.
28. Chanda E, Thomsen EK, Musapa M, Kamuliwo M, Brogdon WG, Norris DE et al. An operational framework for insecticide resistance management planning. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(5):773–779.
29. Durnez L, Van Bortel W, Denis L, Roelants P, Veracx A, Trung HD et al. False positive circumsporozoite protein ELISA: a challenge for the estimation of the entomological inoculation rate of malaria and for vector incrimination. *Malar J.* 2011;10(1):195.

## ANEXO 1. FORMULARIO PARA REGISTRAR INFORMACIÓN SOBRE LA RECOLECCIÓN DE MOSQUITOS Y LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

Código de la aldea  Número de prueba  Fecha (día/mes/año) /  
Nombre del investigador: ..... Código del investigador

### Datos de la zona

País: ..... Provincia: .....  
Distrito: ..... Municipio: ..... Aldea: .....  
Coordenadas GPS UTM\_X . UTM\_Y .

### Datos de la muestra

Especie analizada: ..... Especie en el control: .....  
Sexo: ..... Edad (días): ..... (solo cuando se conozca: colonia y F1)

### Método de recolección

Atrayente humano dentro de la vivienda  Ejemplares en reposo nocturno en interiores   
Ejemplares en reposo matutino en interiores  Recolección en ganado   
Atrayente humano fuera de la vivienda  Ejemplares en reposo fuera de la vivienda   
Otro: especificar ..... Colección de larvas   
Progeny F1   
Colonia  Cepa de la colonia: .....

### Estado fisiológico

No han ingerido sangre  Han ingerido sangre  Semigrávidas  Grávidas

### Datos sobre el insecticida utilizado

Insecticida utilizado: ..... Fecha de caducidad: /  
Papeles impregnados preparados por: .....  
Fecha de primera apertura de la caja: /  
Concentración (1x/5x/10x): .....  
Número de utilizaciones de este papel:   
Condiciones de conservación: Temperatura ambiental  Refrigeración

### Condiciones experimentales

	Periodo de exposición: Inicio Final	
Temperatura °C	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/>
Humedad relativa (%)	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>

## ANEXO 2. FORMULARIO PARA REGISTRAR LOS RESULTADOS DE PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LA CONCENTRACIÓN DISCRIMINANTE Y A LAS CONCENTRACIONES 5X Y 10X



	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Control 1	Control 2
Nº expuestos						

### Número de mosquitos derribados tras 60 minutos de exposición (120 min. para el fenitrotión)

	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Réplica 4		Control 1		Control 2	
	Hora	Nº.	Hora	Nº.	Hora	Nº.	Hora	Nº.	Hora	Nº.	Hora	Nº.
Inicio												
60'												

### Número de mosquitos muertos/vivos\* al final del periodo de espera (24 horas)

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Control 1	Control 2
Nº muertos						
Nº vivos						

\* Este recuento debe hacerse por especie, una vez determinado el taxón de todos los mosquitos muertos y vivos.

### A diligenciar por un supervisor al final de la prueba

Código del supervisor □□□

Observaciones .....

.....

.....

Confirmo que el formulario está completo.

Fecha: □□/□□/□□

Nombre .....

Firma.....

### A diligenciar por el personal de entrada de datos

Auxiliar 1

Auxiliar 2

Fecha □□/□□/□□

Fecha □□/□□/□□

Firma .....

## ANEXO 3. FORMULARIO PARA REGISTRAR LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS CON SINERGISTA (PBO AL 4%) E INSECTICIDA

### Número de mosquitos derribados tras la exposición, por tratamiento y por réplica

Réplica 1	Insecticida solo		PBO solo		Insecticida + PBO		Control disolvente	
	Hora	Nº.	Hora	Nº.	Hora	Nº.	Hora	Nº.
Inicio								
Final								
Réplica 2	Insecticida solo		PBO solo		Insecticida + PBO		Control disolvente	
	Hora	Nº.	Hora	Nº.	Hora	Nº.	Hora	Nº.
Inicio								
Final								
Réplica 3	Insecticida solo		PBO solo		Insecticida + PBO		Control disolvente	
	Hora	Nº.	Hora	Nº.	Hora	Nº.	Hora	Nº.
Inicio								
Final								

### Número de mosquitos muertos/vivos al final del periodo de espera (24 horas), por tratamiento y por réplica

Réplica 1	Insecticida solo	PBO solo	Insecticida + PBO	Control disolvente
Nº muertos				
Nº vivos				
Réplica 2	Insecticida solo	PBO solo	Insecticida + PBO	Control disolvente
Nº muertos				
Nº vivos				
Réplica 3	Insecticida solo	PBO solo	Insecticida + PBO	Control disolvente
Nº muertos				
Nº vivos				



**Cuadro sintético de la mortalidad media registrada en muestras de hembras adultas de *Anopheles* tras exposición a insecticida solamente, a PBO (4%), a insecticida + PBO o a papeles de control con disolvente (no tratados)**

Tratamiento	Nº de réplicas	Tamaño muestral (N)	Porcentaje de mortalidad 24 horas post-exposición
Insecticida solamente			
PBO solamente			
Insecticida + PBO			
Control con disolvente			

PBO: butóxido de piperonilo

**A diligenciar por un supervisor al final de la prueba**

Código del supervisor

Observaciones .....

.....

.....

Confirmo que el formulario está completo.

Fecha: //

Nombre .....

Firma.....

**A diligenciar por el personal de entrada de datos**

Auxiliar 1

Auxiliar 2

Fecha //

Fecha //

Firma .....

## ANEXO 4. CONCENTRACIONES DISCRIMINANTES Y TIEMPO DE EXPOSICIÓN DE LOS INSECTICIDAS HABITUALMENTE UTILIZADOS CONTRA MOSQUITOS DEL GÉNERO *Aedes*

Clase insecticida	Insecticida	Concentración discriminante (%)	Tiempo exposición (horas)
Piretroides	Alfacipermetrina	0,03 <sup>a</sup>	1
	Ciflutrina	0,15 <sup>b</sup>	1
	Deltametrina	0,03 <sup>a</sup>	1
	Etofenprox	0,5 <sup>b</sup>	1
	Lambdacihalotrina	0,03	1
	Permetrina	0,25	1
Organofosfatos	Fenitrotión	1	1
	Malatión	0,8	1
	Pirimifos metil	0,21 <sup>b</sup>	1

<sup>a</sup> Tentativa

<sup>b</sup> Determinada para los mosquitos del género *Anopheles*, tentativa para los *Aedes*.

**Procedimientos de las pruebas para la vigilancia  
de la resistencia a los insecticidas en los mosquitos  
vectores del paludismo. Segunda edición.**

Organización Mundial de la Salud  
20 avenue Appia  
CH 1211 Ginebra 27  
Suiza  
Web: [www.who.int/malaria/es/](http://www.who.int/malaria/es/)

ISBN 978 92 4 351157 3

