Manual para la Vigilancia de la Resistencia a los Insecticidas en el Ecuador

Manual

2019

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA INSPI - DR. LEOPOLDO IZQUIETA PEREZ

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA

Lenín
Toda una Vida
EL GOBIERNO DE TODOS

Autoridades del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública - Dr. Leopoldo Izquieta Pérez
Dra. Tania Mori, Directora Ejecutiva
Dra. Sarita Berrones, Coordinadora General Técnica
Dra. Mayra Wilca, Coordinadora Zonal 9

Equipo de redacción y autores
MSc. Diego Morales V. Responsable del Centro de Referencia Nacional de Vectores, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública - Dr. Leopoldo Izquieta Pérez.
Lic. Paúl Quinatoa, Analista Técnico del Centro de Referencia Nacional de Vectores, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública - Dr. Leopoldo Izquieta Pérez.

Equipo de colaboradores
Lcda. Maribel Albuja, Analista Técnico del Centro de Referencia Nacional de Vectores, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública - Dr. Leopoldo Izquieta Pérez
Lcdo. Roberto Kaslin, Analista Técnico del Centro de Referencia Nacional de Vectores, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública - Dr. Leopoldo Izquieta Pérez
Lcdo. Dino Sánchez, Analista Técnico del Centro de Referencia Nacional de Vectores, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública - Dr. Leopoldo Izquieta Pérez
Tlga. Paulina Ulloa, Analista Técnico del Centro de Referencia Nacional de Vectores, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública - Dr. Leopoldo Izquieta Pérez

Equipo de revisión y validación
Dra. Sarita Berrones, Coordinadora General Técnica
Dr. Manuel González, Director Técnico de Laboratorios de Vigilancia Epidemiológica y Referencia Nacional

Edición general

Dirección Nacional de Normatización

Dirección de Fomento y Transferencia del Conocimiento. Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI "Dr. Leopoldo Izquieta Pérez"
Dra. Angélica Mirella Rivera Guapulema

Editor General de la revista científica INSPILIP del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI "Dr. Leopoldo Izquieta Pérez"
Lcdo. Patricio Vega Luzuriaga, Mgs.

Publicado en 2020
DOI: 10.31790/inspilip.v3i2.89.g164

Tabla de contenido

Glosario de términos 6
Introducción 7
Antecedentes y justificación 7
Objetivo general 8
Objetivos específicos 8
Alcance 8
1. Resistencia a los insecticidas 8
1.1 Método de acción de los insecticidas 8
1.2 Mecanismos de resistencia 9
1.2.1 Alteración del sitio de acción 9
1.2.2 Resistencia metabólica 10
1.3 Tipos de resistencia a los insecticidas 10
1.3.1 Resistencia cruzada 10
1.3.2 Resistencia múltiple 11
2. Metodologías para la evaluación de resistencia a los insecticidas 11
3. Botella impregnada CDC 11
3.1 Materiales y reactivos 11
Materiales 11
Reactivos 11
Material biológico 11
3.2 Procedimientos 12
3.2.1 Preparación del material biológico 12
3.2.2 Preparación de materiales y reactivos 12
3.2.3 Limpieza y secado de las botellas antes del recubrimiento 12
3.2.4 Rotulado de botellas 12
3.2.5 Recubrimiento de botellas 13
3.2.6 Ensayo biológico 14
3.3 Interpretación de resultados 15
3.4 Validez de los resultados 16
4. Metodología del papel impregnado OMS 16
4.1 Materiales y reactivos 16
Material biológico 17
4.2 Procedimientos 17
4.2.1 Preparación de materiales y reactivos 17
4.2.2 Limpieza y secado del material 17
4.2.3 Ensayo biológico 17
4.3 Interpretación de resultados 20
4.4 Validez de los resultados 20
5. Bioensayos de estadios inmaduros 20
5.1 Materiales y reactivos 21
Materiales 21
Reactivos 21
Material biológico 21
5.2 Procedimientos 21
5.2.1 Preparación del material biológico 21
5.2.2 Preparación de materiales y reactivos 21
5.2.3 Limpieza y secado de materiales 21
5.2.4 Rotulado de vasos de exposición 22
5.2.5 Ensayo biológico 22
5.3 Interpretación de resultados 23

5.4 Validez de los resultados 24
6. Ingreso al sistema informático SIRI 24
6.2 Ingreso de datos metodología de la botella impregnada CDC y OMS 26
6.3 Validación de resultados 28
Bibliografía 29
Anexos 31

Índice de figuras

Figura 1. Etiquetado de botellas impregnadas……..... 13
Figura 2. Colocación de insecticida……... 13
Figura 3. Impregnación de insecticida en tapa de botella…….. 13
Figura 4. Impregnación de botella en paredes…… 14
Figura 5. Secado de botellas y rotación de insecticida……... 14
Figura 6. Ingreso de mosquitos en botellas impregnadas…….. 15
Figura 7. Metodología de papel impregnado…… 18
Figura 8. Colocación del papel de mantenimiento……... 19
Figura 9. Ingreso de mosquitos al tubo de reposo…….. 19
Figura 10. Preparación de tubos con insecticida……. 19
Figura 11. Exposición de mosquitos…….. 19
Figura 12. Etiquetado de vasos de exposición……. 22
Figura 13. Medición de las cantidades de agua……... 23
Figura 14. Colocación de dosis de insecticidas…… 23
Figura 15. Colocación de estadios inmaduros……. 23
Figura 16. Exposición de larvas al insecticida…….. 23
Figura 17. Pantalla de inicio sistema SIRI……. 25
Figura 18. Opciones de pruebas de resistencia SIRI…….. 25
Figura 19. Georreferenciación sistema SIRI……. 26
Figura 20. Opciones de ingreso, bioensayo CDC…… 27
Figura 21. Opciones de ingreso, bioensayo OMS……... 27
Figura 22. Opciones de ingreso de réplicas, bioensayo OMS……... 27
Figura 23. Opciones de ingreso, bioensayo OMS inmaduros…… 28

Índice de tablas

Tabla 1. Mecanismos de resistencia a insecticidas 10
Tabla 2. Valoraciones de mortalidad 23

Glosario de términos

Alelos: cada una de las dos o más versiones de un gen, los cuales son heredados por los progenitores para cada gen autosoma. De forma muy simplificada, se puede distinguir entre los llamados alelos normales, o los mutantes, si han sufrido alguna alteración que hace que su secuencia haya cambiado.
Canal de sodio: son proteínas transmembranales que permiten el paso de iones de sodio a través de la membrana celular (intercambio de sustancias).
Dosis diagnóstica: 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.
Fenotípica: rasgos particulares y genéticamente heredados de cualquier organismo que lo hacen único e irrepetible en su clase; se relaciona principalmente a elementos físicos y morfológicos de cada individuo.
Génico: perteneciente o relativo a los genes (característico).
Impregnación: técnica que consiste en recubrir un objeto.
Iones: átomos o grupos de átomos que tienen una carga eléctrica.
Patógeno: agente biológico externo que se aloja en un organismo biológico determinado, dañando o afectando su integridad a partir de enfermedades.
Progenie: descendencia directa de un ser vivo en una generación.
Punto diana: sitio de acción específico.
Silente: eferente a las mutaciones silenciosas, que no se expresan**.**
Toxicidad: capacidad de una sustancia química de producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo.
Xenobióticos: compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente, debido a que son compuestos sintetizados por el hombre en el laboratorio.

Introducción

Las enfermedades transmitidas por vectores (ETV) son enfermedades en las cuales un vector biológico tiene la capacidad de transportar y transmitir un patógeno a otro organismo[1]; principalmente causadas por parásitos, virus y bacterias. Entre los principales vectores tenemos a mosquitos, flebótomos, chinches triatomíneos, simúlidos, garrapatas, moscas, ácaros, caracoles y piojos[2].

Aproximadamente cada año se reportan más de 700.000 defunciones a nivel mundial debido a enfermedades como paludismo, dengue, esquistosomiasis, tripanosomiasis africana humana, leishmaniasis, enfermedad de Chagas y fiebre amarilla, afectando principalmente a las poblaciones más pobres, ubicadas en zonas tropicales y subtropicales[2]. En el Ecuador se ha notificado la presencia de varias arbovirosis como: dengue, zika, chikunguña, fiebre amarilla y fiebre Mayaro, las cuales debido a sus ciclos de transmisión selvática y urbano son de importancia médica. El cambio climático, factores ecosistémicos y sociodemográficos han contribuido a la distribución de vectores de la familia Culicidae, como *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus, Haemagogus* y *Anopheles*, involucrados en la transmisión activa de enfermedades vectoriales, afectando a poblaciones urbanas, urbano-marginales y rurales asentadas en áreas de clima tropical y subtropical, que representan aproximadamente un 70 % de la extensión territorial del país[3].

El control de los vectores ha constituido una estrategia fundamental para la prevención y de las arvobirosis a nivel mundial, principalmente con el uso de insecticidas y la destrucción de criaderos mediante la participación comunitaria. El control químico ha sido la principal actividad durante varios años, logrando la erradicación de dengue en 22 países de Latinoamérica, entre los años de 1948 a 1962 mediante el uso del DDT[4]. Sin embargo, este compuesto presentó un alto nivel de toxicidad en organismos acuáticos, vertebrados e invertebrados y el desarrollo de resistencia en las poblaciones de *Ae. Aegypti,* ocasionado así un incremento de casos por dengue desde el año 1980[4,5]. Actualmente se reporta la resistencia cruzada a insecticidas piretroides como deltametrina, alfacipermetrina como consecuencia del uso intensivo del DDT en México, Perú, Cuba, Colombia, Brasil, Argentina y Venezuela[6-10].

En el Ecuador, el monitoreo de resistencia a los insecticidas se ha realizado desde el año 2016, con el reporte de resistencia a deltametrina en cinco provincias y la susceptibilidad a malatión[11]. En el año 2019 el Instituto Nacional de Investigación en Salud Publica INSPI, a través del Centro de Referencia Nacional de Vectores, realizó un monitoreo de la resistencia a insecticidas en poblaciones de *Ae. aegypti* reportando la resistencia a temefos y malatión, organofosforados utilizados para el control de poblaciones de vectores[12,13]. Estos resultados indican la importancia de realizar un monitoreo continuo de las poblaciones de vectores a nivel nacional para planificar las estrategias de control y el manejo de resistencia a insecticidas.

Antecedentes y justificación

En la actualidad no existe un tratamiento específico o vacunas disponibles contra el zika, dengue y chikunguña, siendo las actividades de control vectorial las principales estrategias disponibles para prevenir y reducir el impacto de enfermedades[14].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) han desarrollado metodologías de evaluación para poblaciones de *Ae. aegypti* y *Anopheles* spp, con el fin de intensificar la vigilancia de la resistencia de insecticidas en cada uno de los países de la región y mantener actualizada la información de resistencia fenotípica y sus mecanismos de

resistencia[15]. Con la detección de resistencia a insecticidas piretroides y organofosforados, se hace indispensable la vigilancia periódica de las poblaciones de vectores en el Ecuador, que permitan orientar las intervenciones de control vectorial.

Actualmente como parte de las estrategias de prevención y control, se ha incorporado la Red Nacional de Laboratorios de Entomología, con seis laboratorios en la región Litoral, tres laboratorios en la región Amazónica, un laboratorio en la región Insular y un laboratorio de referencia nacional, los cuales realizan el monitoreo continuo de resistencia a insecticidas en vectores de importancia médica y la evaluación operativa de metodologías de control vectorial. Estos resultados permitirán adoptar sistemáticamente una metodología de estratificación, focalizar intervenciones en áreas críticas y la implementación de nuevas estrategias a partir de criterios técnicos.

Objetivos

Objetivo general

Establecer los procedimientos estandarizados para la realización de pruebas de resistencia a los insecticidas en *Aedes aegypti* y *Anopheles* spp. en los laboratorios de la Red Nacional de Laboratorios de Entomología.

Objetivos específicos

Estandarizar el ingreso de información de resistencia a los insecticidas en el sistema en línea, para garantizar los resultados y monitorear el estado de las poblaciones a nivel nacional.

Alcance

Este modelo se aplicará a toda la Red de Laboratorios de Entomología del Ministerio de Salud Pública, anclados a las Coordinaciones Zonales de Salud, de acuerdo con la organización y distribución territorial establecida.

El Centro de Referencia Nacional de Vectores es el laboratorio de referencia nacional y será el encargado de liderar, revisar, analizar, supervisar y aprobar las actividades realizadas por los laboratorios de entomología.

Capítulo 1
1. Resistencia a los insecticidas

La resistencia está definida por la capacidad que presentan los insectos para sobrevivir a la exposición de una determinada dosis de insecticida, debido a factores fisiológicos o adaptativos. En muchos de los casos la aparición de resistencia se genera por un factor evolutivo, inducido por una conducta de evasión o por el desarrollo de mecanismos de resistencia[16].

1.1 Mecanismos de acción de los insecticidas

Actualmente se registra un total de 25 grupos de insecticidas y acaricidas, entre los cuales los principales grupos recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para las actividades de control vectorial son: organoclorados (OC), organofosforados (OP), carbamatos (CA) y piretroides (PY)[17]. Todas estas clases

de insecticidas actúan en el sistema nervioso central de los insectos, mediante varios mecanismos de acción.
Los insecticidas organofosforados y carbamatos tienen como punto de acción la acetilcolinesterasa (AChE), la cual es una enzima del sistema nervioso central, encargada de realizar la degradación hidrolítica de la acetilcolina en la sinapsis nerviosa y provoca la interrupción del impulso nervioso.
Los insecticidas piretroides y organoclorados, su punto de acción se encuentra en los canales de sodio, los cuales se mantienen abiertos generando la afluencia continua de iones a través de los axones nerviosos. Como resultado de la acción de insecticidas OP, OC, PY y CA en el sistema nervioso central, se observa la parálisis, convulsiones y muerte de los individuos expuestos[17,18].

1.2 Mecanismos de resistencia

La resistencia a insecticidas se encuentra influenciada por factores genéticos, biológicos y operacionales, los cuales permiten sobrevivir a los individuos a la exposición de los insecticidas. El factor genético se relaciona con el aumento de la frecuencia y dominancia de los alelos de resistencia presentes en la población; el factor biológico influenciado por el ciclo de vida, la alta fecundidad y las tasas de flujo génico de las poblaciones, y el factor operacional representado por la aplicación continua de los insecticidas en las intervenciones de control vectorial[18,19]. Estos factores con el tiempo, dosis, formulación y selección del químico ejercen una presión selectiva provocando el desarrollo de mecanismos de resistencia.
Se han identificado varios mecanismos de resistencia a los insecticidas, entre los cuales se encuentran el cambio de comportamiento, la penetración alterada en la cutícula, la modificación del sitio de acción y la resistencia metabólica. Los dos primeros mecanismos han sido poco investigados y no se encuentran reportes disponibles para mosquitos, sin embargo, la resistencia metabólica y la modificación del punto de acción se han descrito ampliamente y se encuentran involucrados en la resistencia a los insecticidas[17,19].

1.2.1 Alteración del sitio de acción

Este mecanismo de acción se encuentra relacionado con la presencia de mutaciones puntuales no silentes en genes estructurales. La mutación selecciona favorablemente el cambio de aminoácidos, los cuales provocan alteraciones estructurales en la proteína diana, alterando los niveles de toxicidad de los insecticidas sin causar pérdida de la función primaria del sitio de acción. El costo de la eficacia biológica tiene importante implicación para la persistencia de resistencia y/o reversión a la susceptibilidad en poblaciones de campo[18,19].

Canales de sodio dependientes de voltaje (kdr)

La resistencia kdr o knockdown confiere mutaciones puntuales en el canal de voltaje de sodio (1 016Val + 1 534Phe) (1 016Val + 1 534Cyskdr) y (1 016Ilekdr + 1 534Cyskdr) para tolerar dosis a insecticidas piretroides (deltametrina) y organoclorados (DDT), los cuales actúan directamente sobre el sistema nervioso[18,19].

Acetilcolinesterasas (AchE)
Este mecanismo es el principal punto de acción para insecticidas organofosforados (malatión) y carbamatos, los cuales inhiben la actividad enzimática mediante fosforilación en el punto de acción. Las mutaciones

involucran sustituciones de aminoácidos en el sitio activo de la enzima provocando los niveles de insensibilidad a insecticidas[19].

1.2.2 Resistencia metabólica

La resistencia metabólica es el resultado del incremento en la expresión de genes codificadores de enzimas que metabolizan a los principales xenobióticos. Se encuentra relacionada con el aumento de actividad enzimática principalmente de tres familias de enzimas: carboxilesterasas, glutation S-transferasas (GST) y monooxigenasas. Este mecanismo se caracteriza por una ganancia en la capacidad para desintoxicar moléculas de insecticidas, evitando que lleguen a sus objetivos[19].

Carboxilesterasas

Estas enzimas se han asociado como mecanismo de resistencia a organofosforados (malatión), carbamatos y en menor proporción a piretroides (deltametrina). Las esterasas actúan uniéndose rápidamente al insecticida, secuestrando las moléculas antes de que lleguen a su sitio de acción[18,19].

Glutation-S-transferasas

Este mecanismo se asocia principalmente con resistencia a DDT, organofosforados y recientemente piretroides, a través de mecanismos de cambio en la especificidad del sustrato, provocando niveles elevados de actividad enzimática y regulación génica[19].

Citocromos P450

Se ha relacionado a este mecanismo en casi todas las clases de insecticidas, principalmente piretroides y organoclorados[19].

Tabla 1. Mecanismos de resistencia a insecticidas

Mecanismos de resistencia					
	Punto de acción		Metabólico		
	KDR	Acetilcolin esterasas	Carboxile sterasas	Glutation-S-transferasas	Mono-oxigenasas
Piretroides	●		●		●
DDT	●			●	●
Carbamatos		●	●		●
Organofosforados		●	●		●

Fuente: Adaptado de Global report on insecticide resistance in malaria vectors: 2010–2016

1.3 Tipos de resistencia a los insecticidas

1.3.1 Resistencia cruzada

Este tipo de resistencia involucra el mismo mecanismo de resistencia para dos clases de insecticidas, debido a que productos de insecticidas de un mismo grupo químico suelen afectar a un punto de acción en común, por lo que se considera que

comparten un mismo modo de acción. Este tipo de resistencia se presenta generalmente en los insecticidas piretroides y organoclorados[19,20].

1.3.2 Resistencia múltiple

La resistencia múltiple involucra la presencia de diferentes mecanismos en una misma población de insectos. Un individuo desarrolla resistencia a dos a más insecticidas de diferente modo de acción, por el desarrollo de varios mecanismos de resistencia[20].

Capítulo 2
2. Metodologías para la evaluación de resistencia a los insecticidas

La detección de resistencia a insecticidas se encuentra basada en pruebas sencillas de dosis – respuesta, en las cuales se obtiene como resultado la determinación de susceptibilidad o resistencia de una población expuesta. Actualmente la OMS y el CDC han desarrollado varias metodologías para la evaluación de resistencia en individuos adultos e inmaduros, las cuales han permitido distinguir los diferentes niveles de susceptibilidad. Estas metodologías son herramientas de vigilancia en laboratorio y campo, siendo el punto inicial de posteriores estudios para la determinación de mecanismos de resistencia.

3. Botella impregnada CDC

Esta metodología se encuentra definida por el tiempo que tarda un insecticida en ingresar al mosquito, alcanzar su sitio blanco y actuar sobre el mismo; de esta manera la información obtenida proporciona evidencia inicial, de que un insecticida está perdiendo su efectividad en una población de vectores. Esta metodología puede ser realizada en poblaciones colectadas en campo o en poblaciones criadas en laboratorio a partir de larvas.

3.1 Materiales y reactivos

Materiales

- Botellas de vidrio tipo Wheaton de 250 ml.
- Micropipeta y puntas descartables.
- Aspirador manual para mosquitos.
- Envases de transferencia de mosquitos.
- Cronómetro digital.
- Marcador indeleble para rotular.
- Cinta adhesiva para etiquetar.
- Guantes desechables.
- Lápiz y borrador.
- Ficha de registro.

Reactivos

- Insecticidas a ser evaluados, grado técnico o formulaciones.
- Acetona o etanol absoluto de grado analítico.

Material biológico

- Mosquitos de los géneros *Aedes* o *Anopheles*

3.2 Procedimientos

3.2.1 Preparación del material biológico

Los mosquitos que se utilizarán en el bioensayo deberán ser obtenidos en laboratorio a partir de larvas hasta la filial F1 o capturados en campo como adultos; se recomienda una cantidad de 100 mosquitos en cada prueba, los cuales deberán estar alimentados previamente con una solución azucarada al 10 %. Cuando no sea posible disponer del número suficiente de mosquitos, se pueden combinar los resultados con múltiples ensayos biológicos de días diferentes, para lograr el tamaño de muestra recomendada.

Se utilizarán únicamente mosquitos hembras para la realización de bioensayos y los individuos no deben estar alimentados con sangre.

Consideraciones de campo

Cuando se realicen bioensayos en condiciones de campo es importante realizar la identificación taxonómica de las especies, después de haber terminado la prueba, de esta manera se pueden validar los resultados. Se considerará válida la prueba cuando se obtenga un 95 % de predominancia de una especie después de haber realizado la identificación.

3.2.2 Preparación de materiales y reactivos

Todo el material utilizado en el bioensayo deberá estar seco y limpio para su uso y los reactivos deberán encontrarse a temperatura ambiente, con fecha de caducidad vigente para ser utilizados.

3.2.3 Limpieza y secado de las botellas antes del recubrimiento

Las botellas deberán lavarse con abundante agua jabonosa con la ayuda de un cepillo, pasando por los bordes de la botella; el enjuague podrá ser realizado con agua corriente. Para secar las botellas se deberán dejar destapadas a temperatura ambiente o bajo el sol, en el caso de ambientes húmedos se pueden dejar toda la noche o el tiempo que sea necesario. En el caso que se disponga de un horno (estufa) se puede dejar durante 15 a 20 minutos observando que estén completamente secas.

NOTA: Tener cuidado con la limpieza y secado de las botellas después de la finalización del ensayo biológico para evitar la presencia de trazas de insecticida que podrían interferir en futuros ensayos. Para asegurar un procedimiento adecuado de limpieza se puede introducir algunos mosquitos susceptibles, los cuales no deben morir de inmediato; en caso de que esto suceda, se debe repetir el procedimiento de lavado, secado y realizar una nueva prueba con mosquitos.

3.2.4 Rotulado de botellas

Las botellas deberán ser rotuladas con cinta adhesiva, debido a que se utilizarán en posteriores bioensayos. Es importante rotular las botellas y las tapas de manera que cada botella se encuentre asociada con su tapa respectiva, esto permitirá no confundir las botellas que estén impregnadas con insecticidas con la botella control. Se recomienda que las botellas tengan rotulada la siguiente información: tipo de insecticida, número de réplica, concentración del insecticida a utilizar y fecha del ensayo biológico de acuerdo a la siguiente descripción.

Deltametrina	**Réplica 1**
Concentración: 10,46 ppm	
Fecha de preparación: 14/10/2019	
Responsable: JP	

Figura 1. Etiquetado de botellas impregnadas
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

3.2.5 Recubrimiento de botellas

Antes de realizar la impregnación, hay que asegurarse que las botellas se encuentren completamente secas.

Agregar 1 ml de insecticida, etanol o acetona con la ayuda de una micropipeta o pipeta desechable. Si se utiliza la micropipeta se deberá cambiar las puntas para cada sustancia colocada; en el caso que se usen pipetas desechables es importante etiquetar una pipeta con el término “control” para la botella testigo y otra pipeta con “solución insecticida” para las botellas de prueba. Después de haber colocado las sustancias se debe tapar firmemente (fig. 2).

Para que el insecticida o sustancia control quede recubierta completamente en la botella, es necesario agitar suavemente para recubrir el fondo, invertir la botella para recubrir el interior de la tapa y rotar de forma horizontal para que el contenido se distribuya en las paredes de la botella de manera uniforme (fig. 3) (fig. 4).

Cuando haya realizado el procedimiento anterior, deberá quitar las tapas y continuar rotando las botellas hasta observar que el líquido haya desaparecido y las botellas estén completamente secas. Se deberán dejar en posición horizontal y cubiertas de la luz (fig. 5).

Si las botellas no se van a usar de inmediato, deberán ser almacenadas en un lugar oscuro y fresco con sus respectivas tapas para evitar el ingreso de humedad. Si se necesita transportar botellas recubiertas con insecticidas al campo, se deberán llevar completamente tapadas y cubiertas de la luz.

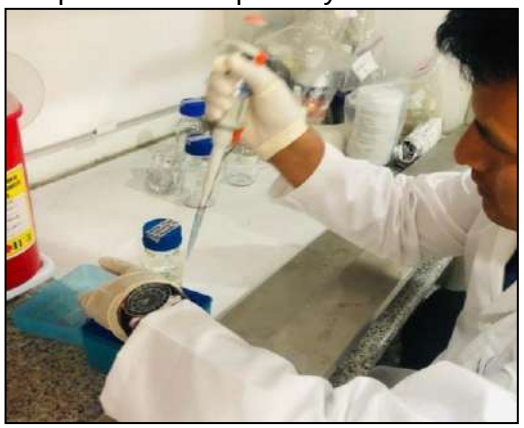

Figura 2. Colocación de insecticida
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

Figura 3. Impregnación de insecticida en tapa de botella
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

Figura 4. Impregnación de botella en paredes
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

Figura 5. Secado de botellas y rotación de insecticida
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

Consideraciones de campo

Si el procedimiento será realizado en condiciones de campo, es importante que se mantenga la cadena de frío durante el transporte. En zonas húmedas la impregnación de las botellas puede dificultarse, debido a las condiciones climáticas y se recomienda realizar la impregnación en laboratorio. Las botellas deberán ser transportadas completamente cubiertas de la luz.

NOTA: Las botellas recubiertas podrán ser utilizadas el mismo día para la evaluación de varios grupos de mosquitos, sin embargo, un factor limitante es la humedad, que podría acumularse en cada introducción de mosquitos. Las botellas podrán ser utilizadas entre bioensayos con un intervalo de dos a cuatro horas. El tiempo que se puede almacenar una botella impregnada es de 24 horas a cinco días, bajo las condiciones anteriormente descritas; este tiempo puede variar dependiendo del insecticida y las condiciones de almacenamiento. Se recomienda utilizar botellas con un máximo de 48 horas después de su impregnación.

Está prohibido secar las botellas después de haber sido recubiertas con insecticida en el horno.

3.2.6 Ensayo biológico

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

Con la ayuda de un aspirador o tubo falcón con malla se deberán introducir, en cada una de las botellas (prueba y control), entre 20 a 25 mosquitos. Tenga precaución al momento de soplar, debido a que los mosquitos pueden golpearse contras las paredes y causar mortalidad sin que el insecticida haga su efecto (fig. 6).

Figura 6. Ingreso de mosquitos en botellas impregnadas
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

Con la ayuda de un cronómetro se deberá contar el número de mosquitos muertos y/o vivos y serán registrados en el formato correspondiente. Las observaciones en cada una de las botellas deberán ser realizadas cada 15 minutos hasta que la totalidad de mosquitos haya muerto o hasta que se cumplan dos horas desde el inicio de la prueba. No es necesario continuar con el ensayo biológico después de dos horas. Recuerde que la mortalidad en el tiempo de diagnóstico es el valor más crítico, ya que representa el límite entre la susceptibilidad y la resistencia (anexo 1).
Se deberá considerar como "muertos" a mosquitos que no puedan mantenerse en pie, presenten vuelo sin coordinación, errático y/o que no tengan movimiento alguno. La mortalidad de la botella control al finalizar el bioensayo deberá ser 0 (cero), sin embargo, si se presentan valores entre el 3 % y 10 %, la mortalidad deberá ser corregida mediante la fórmula de Abbott. Si la mortalidad de la botella control al final del bioensayo es >10 %, los resultados deberán ser descartados, posterior a un análisis técnico.

NOTA: Cuando se realice la introducción de mosquitos con la ayuda del aspirador, es importante que este no tenga contacto físico con la botella, ya que se podría contaminar. Se puede rotar suavemente la botella para facilitar el conteo de los mosquitos. Es más fácil contar el número de mosquitos muertos en las primeras lecturas del ensayo biológico y contar los mosquitos vivos en mediciones posteriores. Recuerde que el número de mosquitos en cada una de las botellas no tiene que ser igual, pero se debe conocer el número inicial de mosquitos.

3.3 Interpretación de resultados

Después de haber registrado las lecturas de mortalidad en las botellas de prueba y en las botellas de control, los datos se deberán organizar y trasladar a una tabla de datos y a su vez ingresar al sistema en línea (http://www.vectores.inspi.gob.ec/inspi/contenido.xhtml).
El criterio propuesto por la Organización Mundial para la Salud (OMS) para evaluar los valores de resistencia es:

- Si la mortalidad calculada se encuentra entre 98 % y 100 % en el tiempo de diagnóstico, indica susceptibilidad en la población evaluada;

- Una mortalidad entre 80 %–97 % en el tiempo de diagnóstico, sugiere la posibilidad de resistencia y debe ser confirmada;
- Un valor calculado <80 % de mortalidad en el tiempo de diagnóstico, sugiere resistencia en la población evaluada.

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

3.4 Validez de los resultados

Al finalizar el bioensayo, la mortalidad de los mosquitos de la botella control debe ser cero o < 10 %. Si el valor de mortalidad es mayor, es necesario repetir el bioensayo, sin embargo, si un grupo de mosquitos es esencialmente irreemplazable y el ensayo biológico no puede ser repetido, la fórmula de Abbott puede ser considerada aun cuando la mortalidad del control sea > 10 %.

La fórmula de mortalidad corregida es la siguiente:

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

Por ejemplo: si la mortalidad en las botellas de exposición es del 50 % en el tiempo de diagnóstico y la mortalidad en el control es del 10 % al finalizar el bioensayo, la mortalidad corregida será: [(50 %-10 %) / (100 %-10 %)] x 100 = 44,4 %.

4. Metodología del papel impregnado OMS

Esta metodología es una prueba de respuesta directa a la exposición de una concentración estándar, en un tiempo definido. La funcionalidad de esta metodología es distinguir entre el nivel de susceptibilidad y la resistencia a insecticidas en mosquitos adultos. A diferencia de la metodología de la botella impregnada, la OMS ha desarrollado un kit de evaluación mediante la impregnación de dosis de insecticidas en papeles, los cuales al contacto con los mosquitos permiten obtener información de la resistencia en las poblaciones evaluadas.

4.1 Materiales y reactivos

- Tubos acrílicos con malla para la evaluación de insecticidas (con punto rojo).
- Tubos acrílicos con malla para el control (con punto amarillo).
- Tubos acrílicos con malla para reposo (con punto verde).
- Aspirador manual para mosquitos.
- Clips.
- Hojas de papel blanco (12 × 15 cm).
- Alambres de cobre.
- Guantes desechables.
- Algodón.
- Cronómetro digital.
- Ficha de registro.

Reactivos

- Papeles impregnados a ser evaluados.

- Papeles impregnados para el control.

Material biológico

- Mosquitos a evaluar

Preparación del material biológico

Se recomienda utilizar hembras adultas obtenidas en laboratorio a partir de larvas procedentes de campo, sin embargo, cuando no sea posible obtener la cantidad suficiente de individuos, se recomienda obtener la primera filial (F1) en el laboratorio y realizar la evaluación de resistencia. Se sugiere que los mosquitos tengan de tres a cinco días de edad, que no hayan ingerido sangre y alimentados con una solución azucarada al 10 %.

Consideraciones de campo

Cuando se utilicen individuos de campo se deberán seleccionar y someter a prueba, únicamente individuos hembras que no se encuentren alimentadas con sangre; en el caso que no se disponga de otros individuos se puede proporcionar agua azucarada para que resistan y unas horas antes de la prueba dejarlas ayunar.

4.2 Procedimientos

4.2.1 Preparación de materiales y reactivos

Todo el material utilizado en el bioensayo debe estar perfectamente limpio y seco para su uso. Los papeles impregnados deberán encontrarse a temperatura ambiente y con fecha de caducidad vigente antes de ser utilizados.

4.2.2 Limpieza y secado del material

Los tubos deberán ser lavados inmediatamente después de haber realizado el bioensayo de resistencia; este procedimiento se deberá realizar con una esponja suave con detergente o jabón, realizando el secado a temperatura ambiente.

Nota: No utilizar sustancias que contengan alcohol para lavar los materiales, estos productos deterioran y reducen la vida útil de los mismos.

4.2.3 Ensayo biológico

Antes de realizar el bioensayo se deberá preparar el material que se va a utilizar, hay que tener en cuenta que se deberá realizar la exposición de 100 a 125 mosquitos; si no se dispone de esa cantidad, se pueden realizar varios bioensayos para completar la cantidad necesaria. En cada bioensayo realizado se debe utilizar un grupo control.

Se debe colocar una hoja de papel blanco de 12 cm x 15 cm enrollada en forma de cilindro; estos papeles deberán estar sujetados por un clip de alambre dentro de cada tubo de mantenimiento (marcado con punto verde). Después de observar que el clip esté correctamente colocado y el papel sin bordes externos, se fijará la unidad corrediza al extremo de cada tubo.

Con la ayuda de un aspirador manual, los mosquitos deberán ingresar al tubo de mantenimiento, a través del orificio en la unidad corrediza en grupos de 20 a 25 mosquitos. Los tubos deberán quedar en posición vertical durante una hora en reposo y se extraerá a los mosquitos que estén moribundos, que presenten incapacidades

para volar o estén muertos. Este procedimiento se realiza para las réplicas, en las cuales se va a realizar la exposición y en el grupo control.

Los tubos de exposición (marcados con punto rojo) deberán ser preparados según el insecticida que se vaya a evaluar; el papel impregnado con insecticida se enrollará en forma de cilindro, con la etiqueta del papel visible externamente. El papel deberá ser fijado contra la pared del tubo sujetándolo con un clip de alambre de cobre y cerrando con la unidad corrediza.

En el caso del tubo de control (marcado con punto amarillo), se deberá colocar el papel impregnado según corresponda el compuesto activo de cada insecticida. Al igual que los otros papeles, se debe colocar en forma de cilindro dentro del tubo de control sujetándolo con un clip de alambre de cobre. Cuando esté correctamente adherido el papel se deberá cerrar con la unidad corrediza.

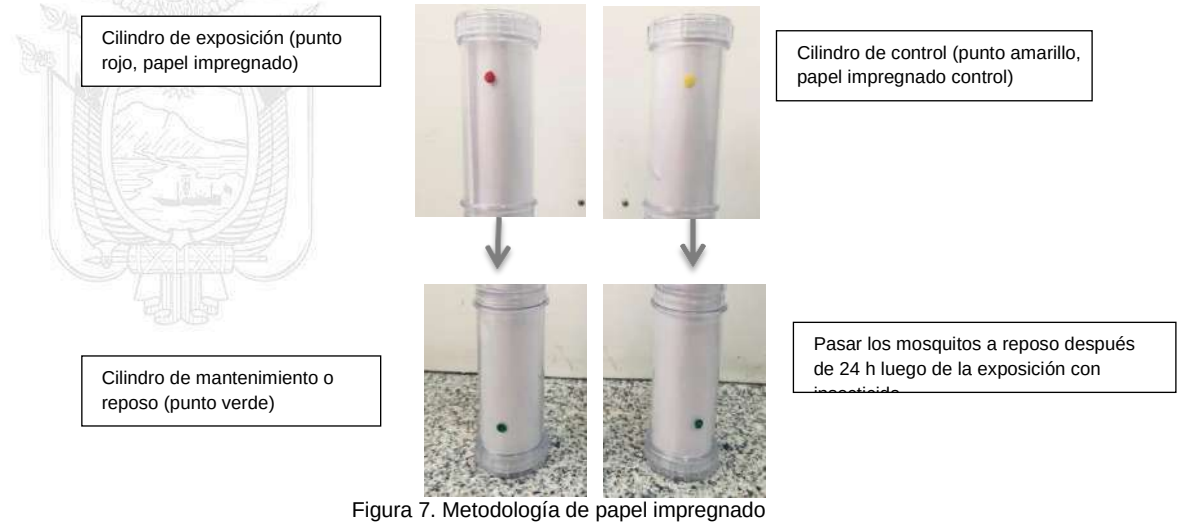

Figura 7. Metodología de papel impregnado
Fuente: OMS

Cuando los tubos de mantenimiento y el tubo de exposición o control se encuentren unidos por la unidad corrediza, se procederá a abrir cuidadosamente para que los mosquitos pasen al tubo de exposición. Una vez que 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), se separan y dejan aparte los tubos de mantenimiento.

Los tubos de exposición deberán quedar en posición vertical con el extremo mallado hacia arriba durante una hora (o el tiempo de exposición especificado, si es distinto). Se recomienda que los tubos de exposición se encuentren 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.

Después haber terminado el tiempo de exposición (1 hora o más, en el caso de ciertos compuestos), los mosquitos deberán regresar a los tubos de mantenimiento cuidadosamente. Cuando todos los mosquitos hayan regresado al tubo de mantenimiento, se separan las unidades corredizas de los tubos de exposición. Se recomienda colocar en el extremo mallado de los tubos de mantenimiento una almohadilla de algodón empapada con una solución azucarada al 10 %.

Los tubos de mantenimiento deberán estar colocados en un lugar sombreado y protegido, en el caso que se disponga de una cámara temperada se recomienda una humedad relativa de 75 % ± 10 % y 27 °C ± 2 °C. Cuando termine el periodo de reposo de 24 horas, se registra el número de mosquitos muertos. Se deberá considerar un mosquito muerto cuando está inmóvil o es incapaz de mantenerse en pie o levantar el vuelo, con base en estos criterios se registrará en la planilla de datos.

Figura 8. Colocación del papel de mantenimiento
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

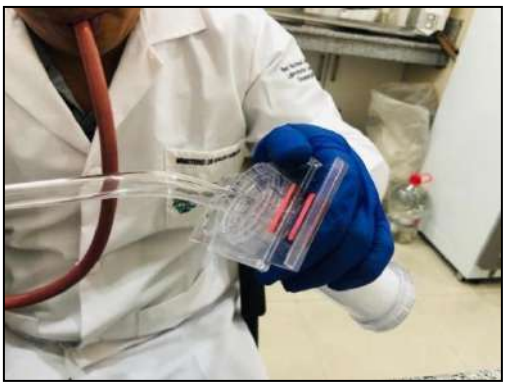

Figura 9. Ingreso de mosquitos al tubo de reposo
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

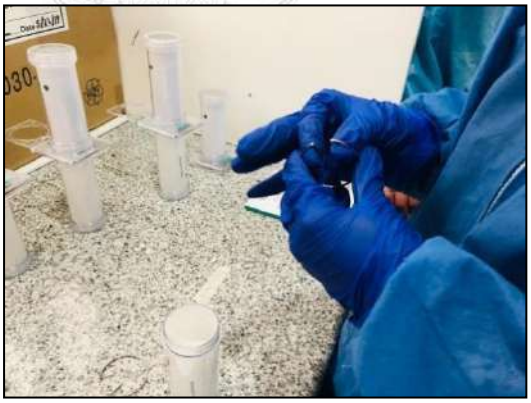

Figura 10. Preparación de tubos con insecticida
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

Figura 11. Exposición de mosquitos
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

Consideraciones para ensayos en campo

Para el uso de mosquitos capturados en campo, se deberán seleccionar únicamente hembras que no se encuentren alimentadas, sin embargo, si no se dispone de más individuos, se deberá proporcionar agua azucarada al 10 % y dejarlos reposar unas horas antes de realizar el bioensayo. Es importante realizar la identificación morfológica de los mosquitos sometidos a bioensayos para calcular con exactitud la mortalidad por especie o por grupo; estas muestras deberán ser almacenadas para realizar análisis posteriores en laboratorio. Se recomienda que los tubos de recuperación sean colocados dentro de un contenedor recubierto humedecido y protegido de los depredadores que puedan ser atraídos por la solución azucarada.

NOTA: Los papeles impregnados podrán ser utilizados hasta **seis veces** y deberán ser almacenados en su caja de plástico completamente cerrado, en refrigeración a 4 ° C. Los tubos de mantenimiento, exposición y de control deberán permanecer en posición vertical. Para realizar los bioensayos es indispensable utilizar guantes de nitrito y evitar el contacto directo con la piel.

4.3 Interpretación de resultados

Después de haber registrado las lecturas de mortalidad de los tubos de mantenimiento y de control después de las 24 h, los datos se deberán organizar y trasladar a una tabla de datos y a su vez ingresar al sistema en línea (http://www.vectores.inspi.gob.ec/inspi/contenido.xhtml).
El criterio propuesto por la Organización Mundial para la Salud (OMS) para evaluar los valores de resistencia detectados es:

- Si la mortalidad calculada se encuentra entre 98 % y 100 % en el tiempo de diagnóstico, indica susceptibilidad en la población evaluada;
- Si la mortalidad se encuentra entre 90 % y 97 %, supone la existencia de resistencia y requiere realizar un nuevo bioensayo con la misma población de mosquitos y el mismo insecticida. Si después de haber realizado al menos dos pruebas y la mortalidad es < 98 %, se da por confirmada la resistencia.
- Cuando la mortalidad calculada sea <90 %, se confirma la resistencia en la población evaluada. Se recomienda analizar los mecanismos de resistencia.

4.4 Validez de los resultados

La mortalidad de los mosquitos en el tubo control al finalizar el bioensayo debe ser cero, sin embargo, si el tubo control presenta mortalidad >20 % la prueba debe ser rechazada. En el caso que un grupo de mosquitos es esencialmente irreemplazable y el ensayo biológico no puede ser repetido, se podrá aplicar la fórmula de Abbott para corregir la mortalidad mediante la siguiente fórmula.

La fórmula de mortalidad corregida es la siguiente:

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

Por ejemplo: si la mortalidad en los tubos de exposición es del 50 % en el tiempo de diagnóstico y la mortalidad en el control es del 10 % al finalizar el bioensayo, la mortalidad corregida será: [(50 %-10 %) / (100 %-10 %)] x 100 = 44,4 %.
La corrección de mortalidad tendrá que ser utilizada cuando se obtenga un valor <20 % en el tubo control.

5. Bioensayos de estadios inmaduros

Esta metodología se ha desarrollado para la evaluación de resistencia a insecticidas en estadio larval, principalmente en poblaciones de *Ae. aegypti.* La información obtenida proporciona la evidencia inicial de que un insecticida está perdiendo su efectividad en la población evaluada; la característica principal de este bioensayo es la determinación de intensidad de resistencia mediante la utilización de dosis estándares. Se recomienda que sea aplicada de forma rutinaria ante la presencia de poblaciones resistentes.

5.1 Materiales y reactivos

Materiales

- Vasos plásticos de 500 ml.
- Probeta de 250 ml.
- Micropipeta y puntas descartables.
- Envases para mantenimiento de individuos.
- Gasa estéril.
- Cronómetro digital.
- Marcador indeleble para rotular.
- Cinta adhesiva para etiquetar.
- Guantes desechables.
- Agitador.
- Linterna.
- Lápiz y borrador.
- Ficha de registro.
- Cartulina oscura.

Reactivos

- Insecticidas a ser evaluados, grado técnico o formulaciones.

Material biológico

- Larvas de la especie a evaluar

5.2 Procedimientos

5.2.1 Preparación del material biológico

Para realizar el bioensayo se deberán utilizar larvas de tercer estadio o cuarto estadio temprano, obtenidos en laboratorio hasta la filial F1 o capturados en campo. Se recomienda utilizar una cantidad mínima de 100 larvas por cada dosis respectivamente con su grupo control. Cuando no sea posible disponer del número suficiente de larvas, se pueden combinar los resultados con múltiples ensayos biológicos de días diferentes con individuos de la misma población, para lograr el tamaño de muestra recomendada.

Consideraciones de campo

Antes de realizar el bioensayo, es importante identificar los individuos colectados.

5.2.2 Preparación de materiales y reactivos

Todos los materiales utilizados en el bioensayo deberán estar perfectamente limpios y secos para su uso, de la misma forma los reactivos deberán encontrarse a temperatura ambiente y con fecha de caducidad vigente para ser utilizados.

5.2.3 Limpieza y secado de materiales

Cuando se utilicen vasos de vidrio o plástico se recomienda lavar con una sustancia jabonosa con un estropajo, refregando las paredes y la base del contenedor. Para secar los vasos se deberán dejar a temperatura ambiente o expuestos a luz solar directa, hasta observar que los contendores estén completamente secos. En el caso de utilizar vasos desechables, se recomienda eliminar los contenedores después de terminar el bioensayo, debido a que las trazas de insecticida se quedan impregnadas en el plástico.

5.2.4 Rotulado de vasos de exposición

Los vasos de exposición deberán ser rotulados con cinta adhesiva, con la siguiente información: tipo de insecticida, número de réplica, concentración del insecticida a utilizar y fecha del ensayo biológico. Hay que tener en cuenta que se van a utilizar varias dosis y no se pueden confundir al momento de aplicar el insecticida; esto evitará resultados erróneos y garantizará los resultados.

Temefos	**Réplica 1**
Concentración: 10,46 ppm	
Fecha de preparación: 14/10/2019	
Responsable: JP	

Figura 12. Etiquetado de vasos de exposición
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

5.2.5 Ensayo biológico

Antes de realizar el bioensayo se deberá verificar que los vasos estén completamente secos. Se deberá etiquetar cada uno de los vasos con las réplicas realizadas y su respectivo grupo control.

En cada uno de los vasos se deberá colocar 249 ml de agua reposada con la ayuda de una probeta.

Con la ayuda de una micropipeta o pipeta plástica se deberá colocar 1 ml de cada solución de temefos o solución control, según corresponda en cada vaso previamente etiquetado. Después de haber colocado las soluciones en los vasos de exposición se deberá agitar y dejar en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Las larvas que se hayan seleccionado para el bioensayo deberán ser colocadas con extremo cuidado en grupos de 20 a 25 larvas en cada vaso. Este procedimiento deberá ser realizado con mucho cuidado para evitar la mortalidad de las larvas.

Cuando se ha completado el ingreso de larvas en los vasos de exposición, se deberán cubrir con una gasa hasta finalizar el bioensayo. Con la ayuda de un cronómetro se deberá registrar la mortalidad observada en cada vaso desde el tiempo inicial (tiempo 0) y después de 24 horas al término de la prueba.

Para realizar el conteo de mortalidad de los vasos de exposición y control, se recomienda utilizar una linterna con una cartulina oscura por debajo para distinguir las larvas vivas, muertas o moribundas. Se considera una larva muerta a individuos que no presentan movimiento, no reaccionan a la luz y presentan dificultad para moverse. Es importante no confundir las exuvias dejadas por las larvas al momento de cambiar de estadio.

El procedimiento para realizar los bioensayos puede ser consultado en https://www.youtube.com/watch?v=KglEciwmBAg.

Nota: Cuando se observe una larva muerta, moribunda antes de ingresar a los vasos de exposición o control, se podrá reemplazar con larvas que cumplan los parámetros establecidos en la sección de material biológico. La presencia de pupas >10 % en el grupo control anula el bioensayo, por lo cual es importante la selección de individuos antes de la prueba. Se recomienda mantener los vasos con larvas a una temperatura de 28 ºC.

Figura 13. Medición de las cantidades de agua
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

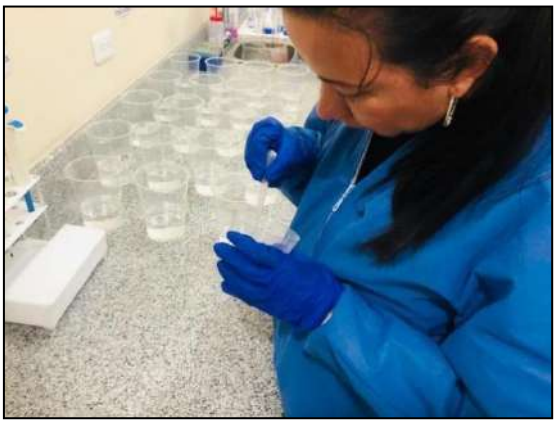

Figura 14. Colocación de dosis de insecticidas
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

Figura 15. Colocación de estadios inmaduros
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

Figura 16. Exposición de larvas al insecticida
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

5.3 Interpretación de resultados

Después de haber registrado las lecturas de mortalidad en los vasos de exposición y control, los datos se deberán organizar y trasladar a una tabla digital y a su vez ingresar al sistema en línea (http://www.vectores.inspi.gob.ec/inspi/contenido.xhtml).
La dosis diagnóstica de temefos es de 0.012 ppm.
Los criterios de susceptibilidad y/o resistencia a temefos en larvas de *Ae. aegypti* con dosis diagnóstica es la siguiente:

Tabla 2. Valoraciones de mortalidad

RANGO ME	ESTADO DE RESISTENCIA
98 al 100 % de mortalidad	Susceptibles
ME < 97 %	Resistencia Moderada
ME < 80%	Resistencia al Insecticida

Fuente: OMS, Procedimientos de las pruebas para la vigilancia de la resistencia a los insecticidas en los mosquitos vectores del paludismo. 2018.

En análisis posteriores se realizará el cálculo de las concentraciones letales (LC) a partir de la mortalidad, mediante una línea de regresión próbit. El cálculo de las concentraciones letales (LC) permitirá obtener el factor de resistencia (FR) que sirven

para vigilar la evolución de la resistencia a los insecticidas en una población de campo y se encuentra catalogado de la siguiente manera.

- Un factor de resistencia (FR) <5 en la población de campo se considera como susceptible.
- FR comprendida entre 5 y 10 se considera que los mosquitos presentan resistencia moderada.
- FR >10 en una población se considera como una resistencia elevada.

Nota: Los cálculos de contracción letal (LC) y factor de resistencia (FR) son calculados por el Sistema de Información de Resistencia a Insecticidas (SIRI).

5.4 Validez de los resultados

La mortalidad de las larvas en los vasos de control al finalizar el bioensayo debe ser cero, sin embargo, si el control presenta una mortalidad >20 % o se observa la presencia de pupas >10 % la prueba debe ser rechazada. En el caso que un grupo de larvas es esencialmente irreemplazable y el ensayo biológico no puede ser repetido, se podrá aplicar la fórmula de Abbott para corregir la mortalidad mediante la siguiente fórmula.

La fórmula de mortalidad corregida es la siguiente:

$$Mortalidad\ corregida = \frac{(mortalidad\ en\ botellas\ prueba\ \% - mortalidad\ en\ botellas\ control\ \%) x\ 100}{(100\ \% - mortalidad\ en\ botellas\ control\ \%)}$$

Por ejemplo: si la mortalidad en los vasos de exposición es del 50 % en el tiempo de diagnóstico y la mortalidad en el control es del 10 % al finalizar el bioensayo, la mortalidad corregida es [(50 %-10 %) / (100%-10 %)] x 100 = 44,4 %.

6. Ingreso al sistema informático SIRI

El Sistema de Información de Resistencia a los Insecticidas (SIRI) fue desarrollado para elaborar mapas, almacenar, analizar y reportar los resultados de las evaluaciones de resistencia realizadas por la Red Nacional de Laboratorios de Entomología.

Previamente para poder ingresar al sistema es necesario solicitar al Centro de Referencia Nacional de Vectores la autorización y creación del perfil de ingreso de información.

6.1 Registro de datos

Para realizar el registro de las pruebas realizadas por el usuario en el sistema, se deberá ingresar con el usuario asignado en la opción de pruebas y seleccionar la opción “Nuevo”, ubicado en la parte superior (fig. 17).

Figura 17. Pantalla de inicio sistema SIRI
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

Se desplegará una ventana en la cual se deberá ingresar la información geográfica, taxonómica y metodológica del bioensayo realizado (fig. 18).

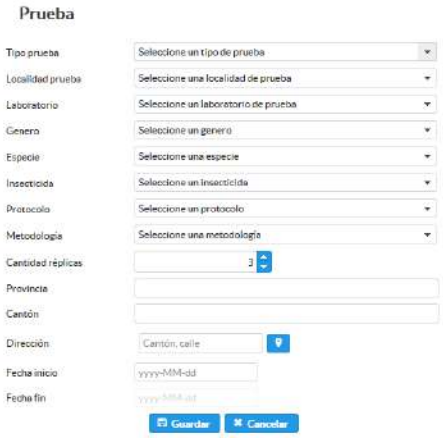

Figura 18. Opciones de pruebas de resistencia SIRI
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

La información dependerá del bioensayo realizado; en la opción de "*localidad prueba"* se deberá seleccionar la coordinación zonal en la cual se realizó el bioensayo, al igual que la opción de "*laboratorio"*.
Es importante seleccionar correctamente la opción de "*protocolo",* para que el sistema pueda habilitar las opciones de "*metodología".* El número de réplicas dependerá del material biológico disponible.
La información geográfica deberá ser ingresada de acuerdo al nivel administrativo de provincia, cantón y localidad. En la opción de "*dirección"* se podrá ingresar las coordenadas geográficas obtenidas mediante un GPS o se podrá mover el símbolo de dirección de acuerdo al lugar específico del bioensayo. Cuando se haya seleccionado la ubicación es importante guardar la información ingresada mediante la opción de "*reverse geocode"* (fig. 19).

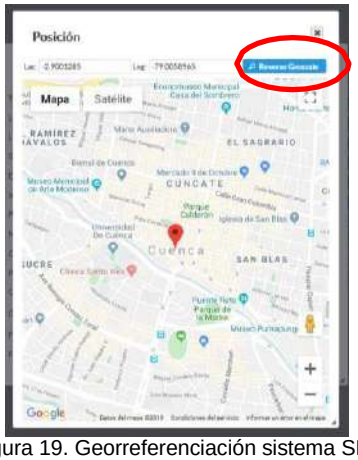

Figura 19. Georreferenciación sistema SIRI
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

Antes de guardar la información se deberá comprobar que los datos ingresados son los correctos y se generará automáticamente el registro de la prueba ingresada.
En el caso de haber detectado un error con la información se puede corregir mediante la opción de "*editar".*

6.2 Ingreso de datos: metodología de la botella impregnada CDC y OMS

Después de haber ingresado la información geográfica y taxonómica del bioensayo, se habilitará el registro de la prueba con un código específico, en el cual se deberá seleccionar la opción de registro para ingresar los valores de mortalidad.
En la ventana de registro aparecerá la información previamente ingresada con el número de réplicas ingresadas.
Se deberá ingresar los valores obtenidos en la realización del bioensayo, colocando en opción de *"total"* el número de individuos utilizados en cada réplica y control. Se podrá modificar únicamente el valor de la columna "*muertos",* debido a que el sistema realiza el cálculo automático de acuerdo al total ingresado previamente. El sistema permite el ingreso de datos hasta 120 minutos, sin embargo, si se realizó la lectura del bioensayo antes de este tiempo se ingresará la información hasta el tiempo de lectura realizado (fig. 20).

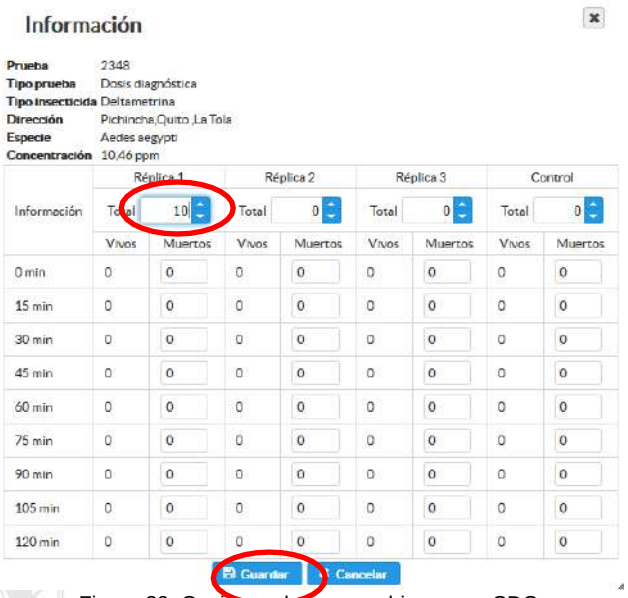

Figura 20. Opciones de ingreso, bioensayo CDC
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

En el caso del ingreso de información de la metodología de papel impregnado OMS, el total de individuos utilizado en cada réplica debe ser ingresado inicialmente antes de ingresar los valores en los tiempos de lectura (fig. 21).

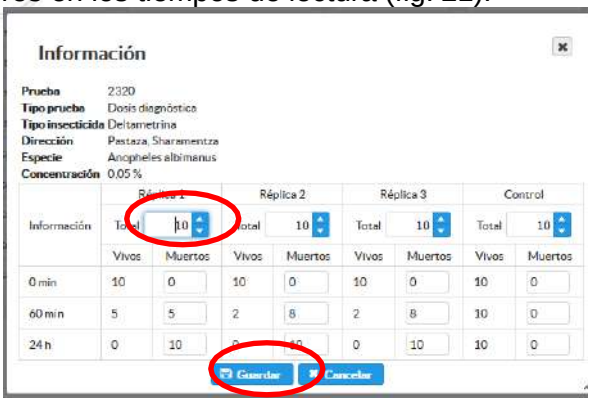

Figura 21. Opciones de ingreso, bioensayo OMS
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

En el caso del ingreso de información para estadios inmaduros en la metodología de la OMS, el sistema previamente mostrará una ventana con las réplicas configuradas, en el cual se deberá seleccionar para ingresar los datos (fig. 22).

Figura 22. Opciones de ingreso de réplicas, bioensayo OMS
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

Después de haber seleccionado la réplica correspondiente, el sistema mostrará una nueva ventana con las dosis de evaluación, en las cuales se deberá ingresar el valor de individuos utilizados en esa réplica e ingresar los datos de mortalidad (fig. 23).

Figura 23. Opciones de ingreso, bioensayo OMS inmaduros
Fuente: Centro de Referencia Nacional de Vectores

Nota. Antes de seleccionar la opción de guardar se deberá revisar que todos los valores sean los correctos.

6.3 Validación de resultados

Después de haber ingresado toda la información, se podrá visualizar un reporte preliminar mediante la opción de "*resultados".* Esta opción permite ver un resumen de todos los valores y comprobar que han sido ingresados correctamente. Para que un bioensayo sea válido, se deberá enviar a revisión mediante la opción de "*solicitar".*

Los bioensayos serán revisados y validados por el Centro de Referencia Nacional de Vectores, el cual enviará a corrección o realizará la respectiva aprobación.

Bibliografía

1. Uribe-Álvarez C, Félix NC. Las enfermedades transmitidas por vectores y el potencial uso de *Wolbachia*, una bacteria endocelular obligada, para erradicarlas. Vol. 60. 2017.
2. OMS. Enfermedades transmitidas por vectores. WHO. World Health Organization; 2017.
3. López-Latorre MA, Neira M. Influencia del cambio climático en la biología de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquito transmisor de arbovirosis humanas. Rev. Ecuat. Med. Cienc. Biol. 2016;37(2):11–21.
4. Bisset J. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia [Internet]. 1561-3054. 2002 [cited 2019 Oct 24]. p. 10. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0375-07602002000300005
5. Becker N et al. Mosquitoes and their control. (Springer, 2010). 2010.
6. De Melo M. Avaliação da resistência a inseticidas e mecanismos selecionados em populações de *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 (Diptera, Culicidae) da fronteira entre Brasil e Guiana Francesa [Internet]. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Oswaldo Cruz; 2017. Available from: https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/27958
7. Rodríguez MM, Bisset JA, Díaz C, Soca LA. Resistencia cruzada a piretroides en *Aedes aegypti* de Cuba inducido por la selección con el insecticida organofosforado malatión. Rev. Cubana Med. Trop. 2003;55(2):105–11.
8. Vargas F, Córdova P O, Alvarado A. Determinación de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti*, *Anopheles albimanus* y *Lutzomyia peruensis* procedentes del norte peruano [Internet]. Vol. 23, Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública. 2006 [cited 2019 Apr 9]. Available from: http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v23n4/a05v23n4.pdf
9. De la Cruz, Gallardo, Carlos M.; Rodríguez-Pérez, Candelario; Ocaña-Zurita FJ. Susceptibilidad y resistencia a insecticida en mosquito transmisor del dengue. Salud en Tabasco [Internet]. 2014 [cited 2019 Oct 24];20(2):54–9. Available from: http://salud.tabasco.gob.mx/content/revista
10. Varón LS, Córdoba BC, Brochero HL. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a DDT, deltametrina y lambdacialotrina en Colombia. Rev. Panam Salud Pública/Pan Am J Public Heal. 2010;27(1):66–73.
11. Morales D, Ponce P, Cevallos V, Espinosa P, Vaca D, Quezada W. Resistance Status of *Aedes aegypti* to deltamethrin, malathion, and temephos in Ecuador . J Am Mosq Control Assoc. 2019;35(2):113–22.
12. MSP. Resistencia a los insecticidas utilizados en control vectorial 2017 - 2018 Ecuador [Internet]. Quito - Ecuador; 2019. Available from: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/07/gaceta_insecticidas_julio2019.pdf
13. Ministerio de Salud del Ecuador. Gaceta vectorial - Enfermedades transmitidas por vectores, sem 52-2018 [Internet]. Quito - Ecuador; 2019. Available from: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/01/GACETA-VECTORES-SE-52.pdf
14. Goindin D, Delannay C, Gelasse A, Ramdini C, Gaude T, Faucon F, et al. Levels of insecticide resistance to deltamethrin, malathion, and temephos, and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from the Guadeloupe and Saint Martin islands (French West Indies). Infect Dis Poverty. 2017 Feb 10;6(1).
15. Organización Panamericana de la Salud - Organización Mundial de la Salud.

Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. 2019. 183 p.

16. Dusfour I, Vontas J, David JP, Weetman D, Fonseca DM, Corbel V, et al. Management of insecticide resistance in the major Aedes vectors of arboviruses: Advances and challenges. Vol. 13, PLoS neglected tropical diseases. NLM (Medline); 2019. p. e0007615.
17. Belinato TA, Martins AJ. Insecticide resistance and fitness cost. In: Insecticides resistance. InTech; 2016.
18. Liu N. Insecticide resistance in mosquitoes: Impact, mechanisms, and research directions. Annu Rev Entomol. 2015;60(1):537–59.
19. Fonseca I, Quinoñes M. Resistencia a insecticidas en mosquitos (Diptera: Culicidae): mecanismos, deteccion y vigilancia en salud pública. Rev. Colomb Entomol [Internet]. 2005 [cited 2019 Nov 11];31(120–488):5. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882005000200001
20. OMS. Procedimientos de las pruebas para la vigilancia de la resistencia a los insecticidas en los mosquitos vectores del paludismo [Internet]. 2017. 288 p. Available from: http://www.cars59.com/wp-content/uploads/2015/08/Investigacion-de-Mercados-BENASSINI-2ED.pdf

Anexos

Anexo 1. Dosis diagnóstica y tiempo diagnóstico para los géneros *Aedes y Anopheles* mediante la metodología CDC

Dosis y tiempo diagnóstico de la metodología CDC para mosquitos *Aedes y Anopheles*			
Insecticida	**Concentración de insecticida por especie**		**Tiempo diagnóstico (min)**
	Anopheles	***Aedes***	
Cipermetrina	12,5	10	30
DDT	100	75	45
Deltametrina	12,5	10,46	30
Permetrina	21,5	15	30
Malatión	50	50	30
Bendiocarb	12,5	12,5	30

Anexo 2. Dosis diagnóstica y tiempo diagnóstico para los géneros *Aedes y Anopheles* mediante la metodología OMS

Dosis y tiempo diagnóstico de la metodología OMS para mosquitos *Aedes y Anopheles*				
Insecticida	**Concentración de insecticida por especie**		**Papel control**	**Tiempo de exposición (min)**
	Anopheles	***Aedes***		
DDT	4	-	Risella	60
Malatión	5	0,8	Oliva	60
Deltametrina	0,05	0,03	Silicona	60
Alfacipermetrina	0,05	0,03	Silicona	60
Permetrina	0,75	0,25	Silicona	60

Anexo 3. Planilla de registro de datos, metodología de la botella impregnada CDC

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA Dr. Leopoldo Izquieta Pérez	**Registro de mortalidad para la evaluación de la resistencia en vectores mediante el Ensayo Biológico de la Botella del CDC**		**Código:**	F-VEC-006
			Edición:	00
	Macro-Proceso: Laboratorios de Vigilancia Epidemiológica y Referencia Nacional	Proceso Interno: Centro de Referencia Nacional de Vectores	**Fecha de Aprobación:**	09/08/2018

Nº de ensayo		Insecticida	
Coordinacion Zonal		Concentración	
Laboratorio		Especie	
Fecha de realización		Localidad	

Tiempo de exposición	**Réplica 1**		**Réplica 2**		**Réplica 3**		**Réplica 4**		**Réplica 5**		**Total**	**Control**		**Total**
	Muertos	**Vivos**	**Muertos**	**Vivos**	**Muertos**	**Vivos**	**Muertos**	**Vivos**	**Muertos**	**Vivos**		**Muertos**	**Vivos**	
0 min														
15 min														
30 min														
45 min														
60 min														
75 min														
90 min														
105 min														
120 min														
Total														

Observaciones:

Realizado por:	Revisado por:

PÁGINA X/Y

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA Dr. Leopoldo Izquieta Pérez	**Registro de mortalidad para la evaluación de la resistencia de insecticidas en vectores mediante el ensayo de papel impregnado OMS**		**Código:**	F-VEC-007
			Edición:	00
	Macro-Proceso: Laboratorios de Vigilancia Epidemiológica y Referencia Nacional	Proceso Interno: Centro de Referencia Nacional de Vectores	**Fecha de Aprobación:**	09/08/2018

Nº de ensayo		Insecticida	
Coordinacion Zonal		Concentración	
Laboratorio		Control	
Localidad		Especie	
Fecha de realización			

Tiempo de exposición	**Réplica 1**		**Réplica 2**		**Réplica 3**		**Réplica 4**		**Total**	**Control**		**Control**		**Total**
	Muertos	**Vivos**	**Muertos**	**Vivos**	**Muertos**	**Vivos**	**Muertos**	**Vivos**		**Muertos**	**Vivos**	**Muertos**	**Vivos**	
0 min														
1 h														
24 h														
Total														

Observaciones:

Realizado por :	Revisado por:

PÁGINA X/Y

Anexo 5. Planilla de registro de datos, metodología de evaluación en estadios inmaduros OMS

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA Dr. Leopoldo Izquieta Pérez	**Registro de mortalidad para la evaluación de la resistencia a los larvicidas**		**Código:**	F-VEC-008
			Edición:	00
	Macro-Proceso: Laboratorios de Vigilancia Epidemiológica y Referencia Nacional	Proceso Interno: Centro de Referencia Nacional de Vectores	**Fecha de Aprobación:**	9/8/2018

Nº de ensayo		Insecticida	
Coordinacion Zonal		Concentración	
Laboratorio		Especie	
Fecha de realización		Localidad	

Revisión después de 24h

Réplica	**0,625 ppm**		**0,125 ppm**		**0,025 ppm**		**0,005 ppm**		**Total**	**Control**		**Total**
	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos		Muertos	Vivos	
Réplica 1												
Réplica 2												
Réplica 3												
Réplica 4												
Réplica 5												
Total												

Observaciones:

Realizado por:	Revisado por:

PÁGINA X/Y