

PROTOCOLO PARA DETERMINACIÓN DE GRADOS DE RESISTENCIA AL TEMEFOS

DIRECCION REDES EN SALUD PÚBLICA



SUBDIRECCIÓN LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA

GRUPO DE ENTOMOLOGÍA

2019

Dirección

Martha Lucia Ospina Martínez
Directora General Instituto Nacional de Salud

Coordinación

Astrid Carolina Flórez Sánchez
Director Técnico
Redes en Salud Pública

Clara del Pilar Zambrano Hernández
Subdirectora
Laboratorio Nacional de Referencia

Patricia Fuya Oviedo
Coordinadora
Grupo de Entomología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública

Elaborado por

Liliana Santacoloma
Grupo de Entomología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública

Como citar este documento

Instituto Nacional de Salud. "Protocolo para determinación de grados de resistencia al Temefos".

TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCION.....	1
2.	OBJETIVO GENERAL	1
2.1.	Objetivos específicos.....	1
3.	ALCANCE.....	2
4.	RESPONSABILIDAD	2
5.	DEFINICIONES	2
6.	CONDICIONES GENERALES.....	3
6.1.	Materiales y equipos	3
6.1.1	Material biológico.....	3
6.1.2	Materiales trabajo de campo y laboratorio	3
6.1.3	Elementos de Bioseguridad	4
6.1.4	Reactivos.....	4
6.1.5	Equipos	4
6.2.	Selección y preparación de las concentraciones de Temefos a evaluar.....	4
6.3.	Obtención de las concentraciones finales en 100 ml de agua	5
6.4.	Aplicación de la prueba OMS	5
6.5.	Determinación de la mortalidad a las diferentes concentraciones	6
6.6.	Obtención de CL50 y CL90 de la cepa de campo y susceptible	7
6.7.	Obtención de los grados de resistencia	7
7.	INDICADORES ENTOMOLÓGICOS	7
8.	DOCUMENTOS DE REFERENCIA	8
9.	ANEXOS	8

1. INTRODUCCION

En Colombia el control de *Aedes aegypti*, se lleva a cabo mediante la utilización de insecticidas para el control de adultos en casos de incremento en el número de casos de arbovirosis o mediante control focal de criaderos. Este último, se centra en campañas educativas dirigidas a la comunidad con el fin de eliminar los criaderos, lo cual se complementa con la aplicación de larvicidas en los depósitos de agua potable de uso doméstico. Los larvicidas utilizados son el organofosforado Temefos, la bacteria *Bacillus thuringiensis* variedad israelensis y los inhibidores de síntesis de quitina. Sin embargo, el Temefos ha sido el larvicida más utilizado en el país debido a su residualidad y facilidad de aplicación, lo cual ha generado poblaciones de *A. aegypti* resistentes por la presión de selección ejercida con esta molécula. Es así como los resultados obtenidos anualmente por la Red Nacional de Vigilancia de la Resistencia a Insecticidas, han evidenciado un porcentaje alto de poblaciones resistentes al Temefos. En este sentido, los resultados de los últimos tres años evidenciaron que el 45%, 66% y 47% del total de poblaciones de *A. aegypti* evaluadas en el país en 2016, 2017 y 2018 respectivamente, presentaron resistencia al Temefos (Datos e no publicados de la Red de VRI).

A pesar que en el país se lleva a cabo la Vigilancia de la resistencia de manera regular, esta información se ha obtenido con la dosis diagnóstica, por lo que es necesario implementar la metodología de determinación de grados de resistencia a este larvicida, con el propósito de conocer la magnitud de dicha resistencia y orientar la toma de decisiones de control en las localidades con transmisión de arbovirosis. El cálculo de los grados de resistencia, consiste en la determinación de la mortalidad de las larvas de *A. aegypti* de campo y la cepa de referencia susceptible, las cuales se exponen a diferentes concentraciones del insecticida y se determina la mortalidad en cada nivel. Con esta información, se realiza un análisis de regresión lineal para obtener la CL50 y CL 90 de la población de campo y de la cepa de referencia. Los grados de resistencia son el producto de dividir el valor de la CL 50 de la población de *A. aegypti* de campo, sobre la CL50 de la cepa susceptible de *A. aegypti*, lo cual corresponde a la cantidad de veces que es necesario incrementar la concentración del insecticida que mata el 50% de la población susceptible para obtener el mismo porcentaje de mortalidad en la población de campo.

El presente protocolo será utilizado para determinar los grados de resistencia de *A. aegypti* al Temefos y su aplicación estará a cargo de un profesional en entomología médica, de la Unidad de Entomología del Laboratorio de Salud Pública de cada departamento, de biólogos profesionales de las Secretarías de Salud Municipal o del Instituto Nacional de Salud.

2. OBJETIVO GENERAL

Proporcionar una metodología para determinar los grados de resistencia al Temefos en poblaciones de larvas de *A. aegypti*, mediante la aplicación de la metodología de la Organización Mundial de la Salud (1981). con el propósito de monitorear cambios en la susceptibilidad de las poblaciones en estudio.

2.1. Objetivos específicos

- Suministrar la metodología de preparación de diferentes concentraciones de temefos a utilizar en la determinación de grados de resistencia.

- Poner a disposición de los Laboratorios de Salud Pública, una metodología de obtención de DL 50 y DL 90.

3. ALCANCE

Este documento será tomado como referencia por los Laboratorios de Entomología de las entidades territoriales, con el fin de determinar los grados de resistencia al temefos como parte de la Vigilancia de la Resistencia a Insecticidas.

4. RESPONSABILIDAD

El presente protocolo será utilizado por los profesionales responsables de la vigilancia entomológica de los Laboratorios de Salud Pública Departamentales y Distritales.

5. DEFINICIONES

Concentración diagnóstica: es el doble de la concentración que produce el 100% de mortalidad en poblaciones que carecen de genes resistentes o son susceptibles (WHO, 1981). La concentración diagnóstica establecida para el temefós es de 0.012 ppm para *A. aegypti*.

Concentración letal 50 (CL50): es la concentración estimada del insecticida que mata el 50 % de la población y se estima generalmente a partir de la regresión lineal (concentración-mortalidad) (WHO, 1981).

Concentración letal 90 (CL90): es la concentración estimada del insecticida que mata el 90% de la población y se obtiene generalmente a partir de la regresión lineal (concentración-mortalidad) (WHO, 1981).

Ensayo biológico: en este documento hace referencia a la exposición de las larvas de la localidad de estudio y de la cepa susceptible Rockefeller (control positivo) a diferentes concentraciones del insecticida, con controles negativos (individuos de la localidad y de la cepa susceptible expuestos al solvente del insecticida) para poder estimar la CL 50 y CL90. Cada concentración puede tener varias repeticiones en un mismo bioensayo.

Grado de resistencia: es el cociente de la concentración letal (CL) 50 o CL 90 de la cepa de campo sobre la CL 50 o CL90 de la cepa susceptible (Rockefeller) y representa el nivel de resistencia de una población.

Resistencia: es la capacidad de los mosquitos para sobrevivir a la exposición a una dosis estándar del insecticida; esta habilidad puede ser el resultado de una adaptación fisiológica o conductual. La aparición de resistencia a los insecticidas en una población de vectores es un fenómeno evolutivo causado ya sea por la evitación en el comportamiento, o por factores fisiológicos mediante el cual se metaboliza el insecticida, no se potencia, o se absorbe menos en mosquitos resistentes que en mosquitos susceptibles (WHO, 2016).

Análisis TRAP (Programa de Análisis de Relaciones de Toxicidad): desarrollado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, es un programa que analiza en este caso la disminución de una variable biológica (supervivencia) de un valor de control a cero a medida que aumenta la exposición química (concentración del insecticida) para estimar la CL 50 y CL90 de las poblaciones a evaluar.

6. CONDICIONES GENERALES

En la figura 1, se resumen los pasos a seguir en la aplicación del protocolo para la determinación de los grados de resistencia al Temefos.

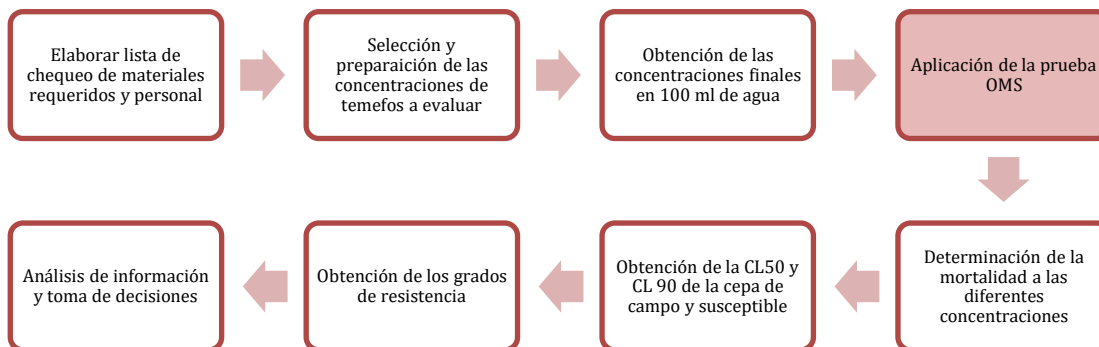


Figura 1. Diagrama de actividades requeridas en determinación de grados de resistencia al Temefos. (Fuente: grupo de Entomología-INS).

6.1. Materiales y equipos

6.1.1 Material biológico

Larvas de tercer estadio de *A. aegypti*

6.1.2 Materiales trabajo de campo y laboratorio

- Agua declorada
- Cinta de enmascarar
- Etanol absoluto
- Soluciones de Insecticida Temefós (Chemservice®)
- Guantes desechables

- Larvas de *A. aegypti* de tercer estadio tardío y cuarto estadio temprano de la población de estudio y de la cepa susceptible (Rockefeller)
- Marcador de punta fina
- Papel Kraft
- Papel parafilm
- Puntas 1000 μ L
- Vasos desechables de 4 oz
- Vasos de precipitados de vidrio de 150 ó 250 mL

6.1.3 Elementos de Bioseguridad

- Máscara con filtros para gases tóxicos
- Guantes

6.1.4 Reactivos

- Temefos grado técnico

6.1.5 Equipos

- Refrigerador o congelador para el almacenamiento de los insecticidas.
- Micropipeta de 1000 μ L
- Pipetas plásticas Pasteur
- Probeta 100 mL
- Termómetro
- Computados

6.2. Selección y preparación de las concentraciones de Temefos a evaluar

Para cada localidad de estudio se evaluará la siguiente gama de concentraciones por ensayo: 0,001 ppm, 0,003 ppm, 0,006 ppm, 0,012 ppm, 0,024 ppm, 0,048 ppm y 0,096 ppm, además de la concentración 0 correspondiente al control etanol. En las poblaciones de campo se realizarán cuatro repeticiones para cada concentración más el control Etanol, cada repetición corresponderá a un vaso de precipitado. En el caso del control positivo, correspondiente a la cepa Rockefeller, se realizará una sola repetición por concentración más el control Etanol

Las concentraciones se prepararán a partir de tres soluciones base de Temefos (0,1 ppm, 0,3 ppm y 100 ppm), utilizando etanol absoluto como solvente. A partir de estas tres concentraciones se obtendrán las siete concentraciones a evaluar. Estas concentraciones serán suministradas por el Laboratorio de Entomología del Instituto Nacional de Salud, previa solicitud por parte del Laboratorio Departamental de Salud Pública.

A partir de la solución de 100 ppm se hace una preparación de una concentración de 1,2 ppm de la cual se obtendrán las concentraciones finales de 0,006, 0,012, 0,024, 0,048 y 0,096 ppm.

V1=Volumen a tomar de 100 ppm
 C1= 100 ppm
 V2= Volumen a preparar 100 mL
 C2= 1,2 ppm

$$V_1 = (V_2 \cdot C_2) / C_1$$

$V_1 = (100 \text{ mL} \cdot 1,2 \text{ ppm}) / (100 \text{ ppm}) = 1,2 \text{ mL}$ de insecticida de 100 ppm + 98,8 mL de etanol absoluto

La concentración en las soluciones de trabajo puede modificarse si se evapora el etanol. Por consiguiente, debe taparse muy cuidadosamente el frasco ámbar que contiene la solución madre de 100 ppm del temefós con papel parafilm y guardarse en el refrigerador (0 a 4 °C) o a -20°C.

6.3. Obtención de las concentraciones finales en 100 ml de agua

Una vez se cuenta con el volumen necesario de las concentraciones de 0,1 ppm, 0,3 ppm y 1,2 ppm, se procederá a realizar el ensayo. En la tabla 1 se resumen las cantidades de las concentraciones de 0,1, 0,3 y 1,2 ppm de temefós que se deben adicionar a un volumen de 100 ml de agua para obtener las siete concentraciones de temefós a evaluar.

Tabla 1. Volumen de cada concentración de etanol adicionar por cada vaso de precipitado con 100 ML de agua

Concentración final de temefós en 100 ml de agua (ppm)	Concentración inicial de temefós (ppm)	Mililitros (mL) de agua a extraer de los 100 ml de agua	Mililitros (mL) de temefós aplicar en 100 ml de agua
0,001	0,1	NA	NA
0,003	0,3	NA	NA
0,006	1,2	0,5	0,5
0,012	1,2	1	1
0,024	1,2	2	2
0,048	1,2	4	4
0,096	1,2	8	8

Fuente: Laboratorio de Entomología-INS

6.4. Aplicación de la prueba OMS

- Rotular los vasos de precipitado con cinta adhesiva, con los siguientes datos: nombre de la localidad a evaluar, concentración, número de repetición y fecha. Marque los controles de la misma manera.
- Colocar 25 larvas por vaso de precipitado. El número de repeticiones debe darse hasta completar como mínimo 100 larvas por concentración. El número ideal de larvas por concentración debe ser entre 160 a 200 para que haya robustez estadística y los intervalos de confianza no estén tan separados a la hora de realizar el análisis estadístico.

- Las larvas de la cepa susceptible Rockefeller son el control positivo y estarán expuestas a diferentes concentraciones del insecticida. Los controles negativos son los individuos de la localidad y de la cepa susceptible Rockefeller expuestos al solvente del insecticida
- Llene los vasos de precipitado con un volumen de 89 ml de agua de clorada.
- Agregue 1 ml de etanol absoluto a los controles negativos con una micropipeta.
- Agregue 1 mL de insecticida de acuerdo a la concentración establecida (Tabla 1) en cada vaso de precipitado con una micropipeta.
- Mezcle con la misma punta de la micropipeta para homogeneizar la solución y deséchela.
- Deje reposar el insecticida en el agua como mínimo media hora antes de introducir las larvas.
- Para cada vaso de precipitado de vidrio, aparte un vaso plástico de 4 oz y marque con un marcador de punta fina un nivel 10 ml.
- Agregue 10 ml al vaso plástico de 4 oz.
- Con una pipeta plástica Pasteur seleccione 25 larvas de tercer o cuarto estadio temprano y agréguelos al vaso desechable de 4 oz. Luego saque con una pipeta plástica Pasteur el exceso de agua que sobrepasa el nivel marcado.
- Agregue las larvas al vaso de precipitado.
- Repita este procedimiento para cada vaso de precipitado.
- Cubra el bioensayo con papel Kraft.
- A las 24 horas se hace los recuentos de mortalidad.

6.5. Determinación de la mortalidad a las diferentes concentraciones

Se consideran larvas muertas las que: 1) no reaccionan cuando se les toca; 2) tienen un movimiento errático frente a las del control; 3) decoloración; 4) presencia de temblores o movimientos descoordinados; 5) rigidez o dificultad al sumergirse cuando hay un estímulo auditivo o no pueden subir a la superficie después de un tiempo razonable.

Las larvas que se transformen en pupas durante la prueba quedan excluidas del recuento. Si más del 10% de las larvas de los controles negativos pupan, el bioensayo debe ser descartado y debe repetirse. Si la mortalidad en los controles negativos es igual o superior al 20% el bioensayo debe repetirse.

Para calcular el porcentaje de mortalidad por concentración, se suma el número de larvas muertas y expuestas a través de todas las repeticiones y luego expresando esto como un porcentaje:

$$\text{Porcentaje de Mortalidad Observada} = \frac{\text{Número total de larvas muertas por concentración}}{\text{Total de larvas expuestas por concentración}} \times 100\%$$

Si la mortalidad del control supera el 20%, el bioensayo se descarta. Cuando la mortalidad del control oscila entre el 5 y el 20%, se corrige los porcentajes de mortalidad mediante la fórmula Abbott (1925):

$$\text{Mortalidad Corregida} = \frac{\% \text{ de mortalidad de los expuestos} - \% \text{ de mortalidad del control}}{100 - \% \text{ de mortalidad del control}} \times 100$$

6.6. Obtención de CL50 y CL90 de la cepa de campo y susceptible

Con los resultados de mortalidad a las diferentes concentraciones se obtienen las concentraciones letales 50 y 90 (CL50 y CL 90) de la cepa de estudio y de la cepa susceptible (Rockefeller), las cuales se determinan mediante un análisis Probit que puede realizarse utilizando cualquiera de los siguientes métodos: 1) gráfico, realizando la gráfica de dosis respuesta sobre papel logarítmico; 2) manual, mediante el uso de calculadora y 3) programa para computadora, que en la mayoría de los casos hacen parte de los programas estadísticos.

En cuanto a los tres métodos utilizados para determinar las CL50 y CL90, el más recomendado por el tiempo y confiabilidad de los resultados, es el programa de Probit, sin embargo la mayoría de los Laboratorios Departamentales de Salud (LDSP), no cuentan con licencias para programas estadísticos. Por lo anterior, una buena alternativa es utilizar programas estadísticos de libre acceso a través de internet. En el Anexo 2 del presente protocolo, se dan instrucciones para la instalación y uso del Toxicity Relations Analysis Program (Trap) un programa de análisis Probit de la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos (EPA), el cual es de acceso gratuito a través de internet. Es de aclarar que es solo una orientación y que los LDSP tienen la autonomía de utilizar el programa que mejor se adapten a sus necesidades.

6.7. Obtención de los grados de resistencia

Una vez obtenidas la CL 50 y CL 90 de la población de campo y de la cepa susceptible Rockefeller utilizando el programa de elección, se procede a calcular los grados de resistencia (Mazarri y Georghiou, 1995), dividiendo CL50 cepa de estudio/ CL50 de la cepa susceptible y la CL90 de la cepa de estudio/CL90 de la cepa susceptible.

7. INDICADORES ENTOMOLÓGICOS

El valor obtenido denominado grados de resistencia, corresponde al número de veces que es necesario incrementar la concentración de insecticida que mata el 50% de la población de referencia susceptible para obtener el mismo porcentaje de mortalidad de la población de campo.

La interpretación de los valores obtenidos, se realiza de acuerdo al criterio de Mazarri y Georghiou (1995), así:

Si el valor es:

- Menor a 5 (<5) indica nivel de resistencia bajo.
- Se encuentra en un rango entre 5 y 10 indica nivel de resistencia medio. Mayor a 10 (>10) indica nivel de resistencia alto.

8. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Abbott, WS. A method computing the effectiveness of an insecticide. (1925) *J Econ Entomol*, 18:265-67.

Análisis TRAP. (2020). Toxicity Relationship Analysis Program. U.S. Environmental Protection Agency. https://archive.epa.gov/med/med_archive_03/web/html/trap.html. Fecha de Consulta: 25 de marzo de 2020.

Mazarri M, Georghiou G. (1995). Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc*, 11:315-322.

World Health Organization. (1981). Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. WHO/VBC/81.807, 6 p.

9. ANEXOS

Anexo 1: Resultados de mortalidad de larvas evaluadas a diferentes concentraciones de temefos

Anexo 2: Obtención de la DL50 y DL 99 mediante el Programa Toxicity Relations Analysis Program (TRAP).

ANEXO 1: Resultados de mortalidad de larvas evaluadas a diferentes concentraciones de temefos

Departamento _____		Municipio: _____		Localidad: _____		
Fecha de prueba: - _____				Temperatura del agua: _____		
Responsable: _____						
Temefos []	Nº de Beaker	Larvas Expuestas	Mortalidad a 24 horas	% Mortalidad	% Mortalidad Abbot	Nº de Pupas
	1					
	2					
	3					
	4					
	Control -					
	Control +					
	1					
	2					
	3					
	4					
	Control -					
	Control +					
	1					
	2					
	3					
	4					
	Control -					
	Control +					
	1					
	2					
	3					
	4					
	Control -					
	Control +					

Fuente: Laboratorio de Entomología-INS

ANEXO 2: Obtención de DL 50 Y DL 99 mediante el programa Toxicity Relations Analysis Program (TRAP)

1. Instalación del Programa TRAP en el computador

Ingrese a Internet a través del link https://archive.epa.gov/med/med_archive_03/web/html/trap.html

Seleccione la opción TRAP version 1.30a para descargar el programa (figura 1)

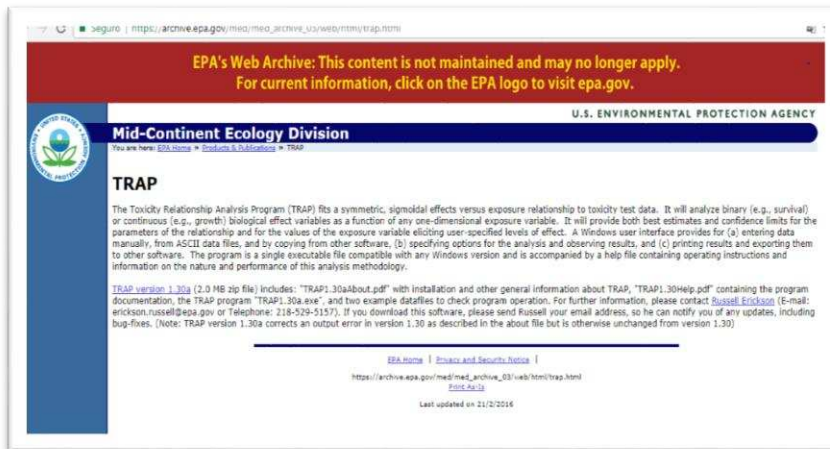


Figura 1. Imagen de ingreso al Programa TRAP (Fuente: EPA).

Una vez terminada la descarga se podrá ver un archivo .zip. Dar click derecho en el archivo y seleccionar la opción extraer aquí. Posteriormente Dar click en el archivo aplicativo trap1.301.exe (figura 2)

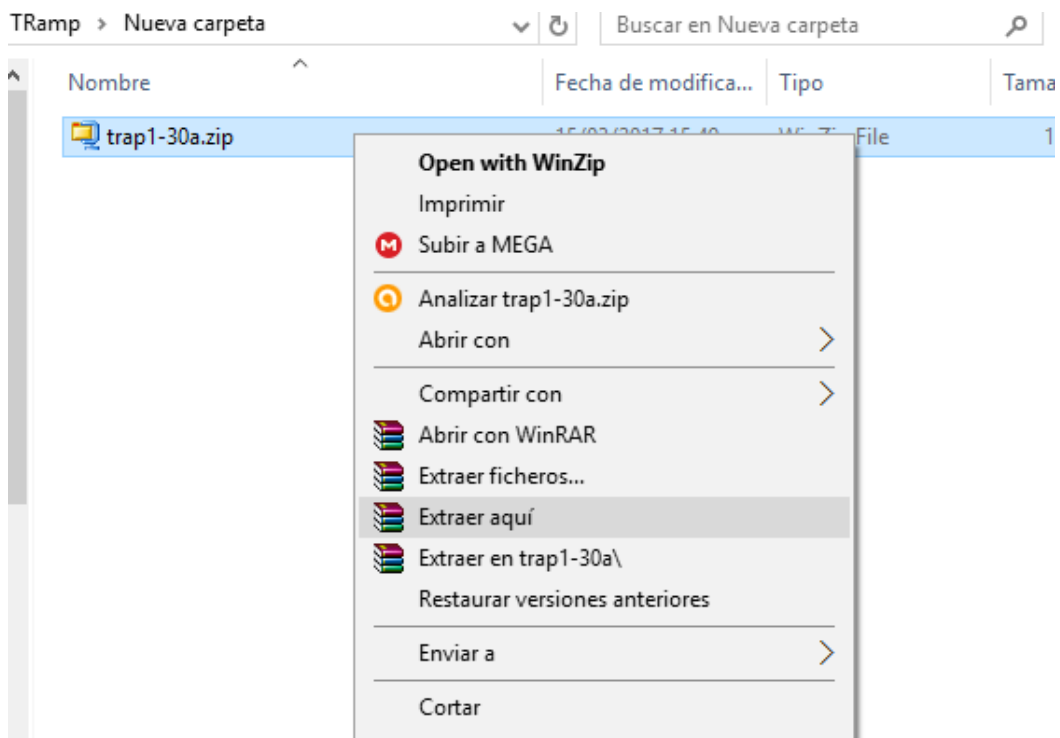


Figura 2. Extracción de archivo comprimido en ZIP .

2. Ingreso de los datos al programa

Para los datos al programa de manera adecuada, siga los siguientes pasos:

-Organice en tres columnas los datos obtenidos en las pruebas biológicas, de la siguiente manera: 1) concentración del temefós, 2) total de sobrevivientes por concentración y 3) número total de individuos expuestos por concentración. En lo posible utilice organice los datos en Excel para facilitar el proceso.

-Abra el aplicativo TRAP.

-Configure el programa de la siguiente manera: en Analysis Type (tipo de análisis) seleccione la opción Tolerance Distribution la cual es la recomendada para la evaluación de análisis probit; en Model Shape (forma del modelo) seleccione el modelo: gaussian distribution; en # of parameters (número de parámetros) seleccione two (dos).

-En la opción Exposure Variable Transform escoja Logarithm. Finalmente, la configuración del programa debe quedar del siguiente modo (Figura 3).

Ingresar los datos en el Formulario de Ingreso de datos, para lo cual se debe tener en cuenta que:

- Exposure Variable se refiere a la concentración del insecticida
- # org w/o response corresponde a los individuos sobrevivientes a la exposición del insecticida.

Total # organisms es igual al número total de individuos expuestos a cada una de las concentraciones estudiadas.

Los resultados a ingresar al programa corresponderán a la sumatoria de los sobrevivientes de las cuatro repeticiones de cada tratamiento y el número total de larvas expuestas a esa concentración. Al ingresar los datos también se debe de señalar el resultado del control negativo, haciendo click en el recuadro blanco al final de la fila correspondiente (Figura 3).

3. Obtención de la CL50 y CL 90

El primer paso para obtener las concentraciones CL50 y CL90, es seleccionar en el menú ubicado en parte superior el ítem Analysis y en la lista desplegable, la opción Parameter Estimation. Posteriormente, aparecen en la pantalla del computador la tabla de análisis de resultados con la gráfica correspondiente a la figura 3. (figura 3)

Para realizar la estimación de la concentración letal 50 y 90 (CL50 y CL 90), se ingresa al menú Analysis y se selecciona Xp Estimation, posteriormente se abrirá un recuadro con las diferentes mortalidades. Adicionalmente, en la opción p puede cambiar manualmente el porcentaje deseado y en la opción graph options, podrá editar la gráfica

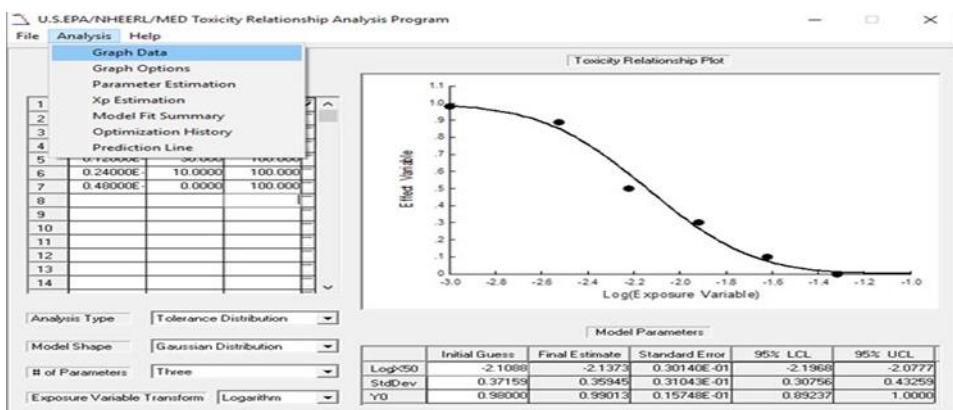



Figura 3. Ingreso de datos de dosis respuesta al programa y obtención de CL 50 y 90 mediante TRAP (Fuente: EPA)

 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
	Liliana Santacoloma	Olga Patricia Fuya	Susanne Carolina Ardila
	Responsable técnico Entomología	Líder técnico Grupo Entomología	Coordinadora Grupo de Entomología