



إجراءات الاختبار لمراقبة مقاومة مبيد الحشرات في البعوض الناقل للملاريا





إجراءات الاختبار لمراقبة مقاومة مبيد الحشرات في البعوض الناقل للملاريا

بيانات الفهرسة أثناء النشر
منظمة الصحة العالمية. المكتب الإقليمي لشرق المتوسط
إجراءات الاختبار لمراقبة مقاومة مبيد الحشرات في البعوض الناقل للملاريا / منظمة الصحة العالمية. المكتب الإقليمي لشرق المتوسط
ص.

صدرت الطبعة الإنجليزية في جنيف 2013 (ISBN: 978-92-4-150515-4)
1. مقاومة مبيدات الحشرات 2. الملاريا - وقاية و مكافحة 3. مبيدات الحشرات 4. مكافحة الحشرات
أ. العنوان ب. المكتب الإقليمي لشرق المتوسط
(تصنيف المكتبة الطبية القومية: WA 240) (ISBN: 978-92-9274-643-8)
(متاح على شبكة الإنترنت) (ISBN: 978-92-9274-644-5)
صدر هذا المنشور في الأصل بالرقم الدولي الموحد: 978-92-9022-080-0، 978-92-9022-079-4

© منظمة الصحة العالمية، 2015. جميع الحقوق محفوظة.
التسميات المستخدمة في هذه المنشورة، وطريقة عرض المواد الواردة فيها، لا تعبر عن رأي منظمة الصحة العالمية بشأن الوضع القانوني لأي بلد، أو إقليم، أو مدينة، أو منطقة، أو لسلطات أي منها، أو بشأن تحديد حدودها أو تخومها. وتشكل الخطوط المنقوطة على الخرائط خطوطاً حدودية تقريبية قد لا يوجد بعد اتفاق كامل عليها.

كما أن ذكر شركات بعينها أو منتجات جهات صانعة معينة لا يعني أن هذه الشركات أو المنتجات معتمدة أو موصى بها من قبل منظمة الصحة العالمية، تفضيلاً لها على سواها مما يمثّلها ولم يرد ذكره. وفيما عدا الخطأ والسهو، تميز أسماء المنتجات المسجلة الملكية بوضع خط تحتها.

وقد اتخذت منظمة الصحة العالمية كل الاحتياطات المعقولة للتحقق من المعلومات التي تحتويها هذه المنشورة، غير أن هذه المادة المنشورة يجري توزيعها دون أي ضمان من أي نوع، صراحةً أو ضمناً. ومن ثم تقع على القارئ وحده مسؤولية تفسير المادة واستخدامها. ولا تتحمل منظمة الصحة العالمية بأي حال أي مسؤولية عما يترتب على استخدامها من أضرار.

ويمكن الحصول على منشورات منظمة الصحة العالمية من وحدة تبادل المعارف والإنتاج، المكتب الإقليمي لمنظمة الصحة العالمية لشرق المتوسط، ص. ب. 7608، مدينة نصر، القاهرة 11371، مصر (هاتف رقم: +20226702535، فاكس رقم: +20226702492؛ وعنوان البريد الإلكتروني: emrgoksp@who.int). علماً بأن طلبات الحصول على الإذن باستنساخ أو ترجمة منشورات المكتب الإقليمي لمنظمة الصحة العالمية لشرق المتوسط، جزئياً أو كلياً، سواء كان ذلك لأغراض بيعها أو توزيعها توزيعاً غير تجاري، ينبغي توجيهها إلى المكتب الإقليمي لشرق المتوسط، على العنوان المذكور أعلاه؛ والبريد الإلكتروني: emrgoegp@who.int.

المحتويات

4	كلمة شكر
5	مسرد
7	1. مقدمة
10	2. تطور اختبار الحساسية بحسب منظمة الصحة العالمية : ملابسات النسخة المنقحة الحالية
12	3. اختبار حساسية البعوض البالغ بحسب منظمة الصحة العالمية
12	1.3 تراكيز التمييز
12	2.3 المعدات والتجهيزات
16	3.3 مراسم الاعتيان
20	4.3 شروط الاختبار ومراسمه
22	4. تسجيل نتائج اختبار الحساسية والتبليغ عنها
22	1.4 حساب معدل الموت ومعدلات الصرع
23	2.4 تفسير نتائج اختبار الحساسية
24	3.4 التبليغ عن نتائج اختبار الحساسية
25	5. استقصاءات مستقبلية: التعرف على آليات المقاومة
25	1.5 مقاييس الإنزيم الكيميائية البيولوجية
26	2.5 الاختبارات الجزيئية (البيولوجية)
26	3.5 مقاييس المؤازر
27	6. اختبارات الحساسية المكتملة : المقاييس البيولوجية بال qarورة بحسب مراكز مكافحة الأمراض والوقاية منها
29	7. توصيات إضافية
30	المراجع
32	الملحق 1 استمارة تسجيل معطيات اختبار الحساسية في الميدان
33	الملحق 2 استمارة تسجيل نتائج إجراء اختبار الحساسية في الميدان

كلمة شكر

لقد ساهم الأشخاص التالية أسماؤهم في تطوير إجراءات الاختبار. ويود برنامج الملاريا العالمي ومنظمة الصحة العالمية شكرهم لمساهماتهم القيمة : مورين كوتزي، باسل بروك، فابريس شندر، جانيت همينغواي، جوناثان لاينز، فنسنت كوربل، بيل فورغدون، مارتن أكوغبتو، مارك رولاند، مارتن دونيلي، إيمو كلنشمدة، مارك كوزمانس، هيلاري رونسون، بوب ورتز، رتشارد هنت، ليزيت كوكيمور، جوس نيكوبي، بيركينيش أمنشوا، ماغران باجاويوكو، كاترين أولتمان، ميشيل ماكدونالد، روبرت نيومان، أبراهام مانزافا.

جين مقاومة الموقع المستهدف لمبيد الحشرات من الكاربامات والفسفات العضوية مانحاً أسيتيل كولين إستيراز غير حساس، ناجم عن طفرة مفردة، G119S، للجين Ace-1.	Ace-I
عندما تمنح مقاومةً لأحد مبيدات الحشرات مقاومةً لمبيد حشرات آخر - حتى لو لم تكن الحشرة قد تعرضت للمنتج الأخير.	مقاومة متصالبة Cross-resistance
تعني، بشكل عام، «نسل الجيل الأول»، إلا أن في هذا السياق تشير إلى استخدام بعوض بالغ نما من بيض بعوض إناث ممسوكة من البرية بهدف الحصول على عينة معيارية للعمر من الجمهرة البرية لإجراء اختبارات المقايسة البيولوجية للمقاومة.	نسل الجيل الأول F1 progeny
استخدام مبيدين للحشرات أو أكثر داخل المبنى (مثلاً استخدام مبيد حشرات على الجدران، والآخر على الشبكات في نفس المنزل). تختلف تواليف مبيدات الحشرات عن مزائج مبيدات الحشرات بأنه يرجح - بدون ضمان- أن تلامس نفس الحشرة كلا المبيدين.	توليفة مبيدات الحشرات Insecticide combination
مزج مركبان أو أكثر ضمن منتج واحد أو تركيبة واحدة، وبذلك سيلامس البعوض كليهما في نفس الوقت.	مزيج مبيدات الحشرات Insecticide mixture
تنجم مقاومة الصرع knockdown resistance عن سلسلة من الجينات المكتنفة في طفرة في قناة أيون الصوديوم، وهي الموقع المستهدف لمركبات البيريثرويد وثنائي كلورو- ثنائي فينيل ثلاثي كلوروايثان (ددت)، وتمنح مقاومة لمبيدات الحشرات هذه.	مقاومة الصرع kdr
اختبارات الحساسية: مقايسات بيولوجية bioassays وفيها تتعرض حشرات من جمهرة برية إلى جرعة ثابتة من مبيد حشرات مصمم لقتل الحشرات الحساسية على نحو يعول عليه؛ ولذلك فإن أي حشرات تبقى حية (ناجية) يفترض أنها أصبحت مقاومة. إن طريقة منظمة الصحة العالمية المعيارية تأسست منذ زمن طويل، في حين أن طريقة مراكز مكافحة الأمراض والوقاية منها CDC جرى تطويرها حديثاً.	اختبارات الحساسية Susceptibility tests
يقال عن الأنواع التي تشغل نفس المنطقة تقريباً من الأرض، لكن لا يحدث تزاوج بين الأقارب، أنها تعيش في توأف.	التوآف Sympatry
مادة ليس لها خصائص مبيد الحشرات بحد ذاتها، لكنها عندما تخرج أو تطبق مع مبيد حشرات من صنف معين تعزز، و بشكل معتبر، فاعليته بتثبيط إنزيم يعمل في الحالة السوية على إزالة سمية مبيد الحشرات.	المؤازر Synergist

1. مقدمة

أدت جهود مكافحة الملاريا العالمية إلى نتائج ملحوظة في العقد الماضي. ففي العام 2010 على سبيل المثال: قدر أن هناك 219 مليون نوبة من الملاريا (تتراوح من 154 - 289 مليوناً)؛ وقدر حدوث 660000 وفاة (تتراوح من 490000 - 836000 حالة). وهذه الأرقام أقل من السنوات السابقة بدرجة يعتد بها، وعلى نحو مماثل: قدر أنه تم تجنب 1,1 مليون وفاة من الملاريا خلال العقد الماضي؛ وتم إنقاذ 58 % من هذه الأرواح في عشرة بلدان تعاني من العبء الأعلى للملاريا (1). وتحقق الكثير من التراجع الحالي في العبء العالمي للملاريا من خلال توسيع نطاق مداخلات مكافحة الناقل، وعلى نحو خاص استخدام مبيدات الحشرات للرش الشمالي داخل المباني، ومعالجة ناموسيات البعوض، ومواد أخرى (2).

ورغم أن الأصناف الأربعة من مبيدات الحشرات موصى بها من قبل منظمة الصحة العالمية للاستخدام ضد البعوض البالغ في برامج الصحة العامة¹، إلا أن مكافحة ناقل الملاريا أصبحت تعتمد عملياً، وبدرجة كبيرة حالياً، على صنف واحد فقط من مبيدات الحشرات- وهو مركبات البيريثرويد pyrethroids. وتمتلك مركبات البيريثرويد عدة مزايا على مبيدات الحشرات الأخرى، فيما يخص بالتكلفة والسلامة (المأمونية) (لأنها أقل سمية على الثدييات) ومدة الأثر الشمالي. وتستخدم مبيدات الحشرات هذه على نطاق واسع حالياً، في كل من الزراعة، ومبيدات للهوام في المنزل، أما استخدامها كمبيدات لليرقات فمحدود بسبب سميتها على الكائنات الحية المائية غير المستهدفة بما في ذلك كالأسمك. وتستخدم مركبات البيريثرويد حالياً على كل الشبكات المبيدة للحشرات المديدة البقاء long-lasting insecticidal nets المعتمدة؛ وهي الأساس للغالبية العظمى من برامج الرش الشمالي داخل المباني في العالم أجمع (3).

أثار الاستعمال العالمي لصنف واحد من مبيدات الحشرات في كل مكان تقريباً مخاوف قوية حول مشكلة مقاومة مبيدات الحشرات في نواقل الملاريا. وتم جمع معطيات كافية حالياً بعد زيادة التردد الحشري في المناطق المتأثرة بالملاريا في السنوات الأخيرة، لتؤكد وجود شكوك قوية مسبقة بأن الاستعمال الواسع النطاق لاستراتيجيات مكافحة الملاريا المرتكزة على مبيدات الحشرات خلال العقد الماضي قد ترافق مع ظهور مقاومة في أنواع عديدة مهمة من الناقل، بما في ذلك الأنوفيلة الغامبية *Anopheles gambiae*، والأنوفيلة العربية *Anarabiensis*، والأنوفيلة المشؤومة *Anfunestus*. وحسب التقارير الأخيرة فقد اكتشفت مقاومة لصنف واحد على الأقل من مبيدات الحشرات في 64 بلداً فيها سارية مستمرة للملاريا، وكانت المقاومة للبيريثرويد هي الأكثر شيوعاً. وذكرت المقاومة للبيريثرويد في جماهر البعوض الناقل للملاريا في 27 بلداً في أفريقيا جنوب الصحراء (4). واكتشفت الآليات المسؤولة عن المستويات المنتشرة للمقاومة حالياً؛ حيث تنزع لتكون من نمطين رئيسيين: إما بواسطة تغيرات في الموقع المستهدف لمبيد الحشرات (مثل طفرات مقاومة الصرع)؛ أو تلك الناجمة عن زيادات في معدل استقلاب مبيد الحشرات. وشرحت آليات المقاومة ومقتضياتها على استراتيجيات مكافحة الناقل بشكل أوسع في الإطار 1-1.

وقد استجاب مجتمع الملاريا الدولي للتهديد المحتمل الناجم عن بزوغ مقاومة لمبيدات الحشرات؛ ففي شهر أيار/مايو عام 2012 أطلقت منظمة الصحة العالمية الخطة العالمية لإدارة مقاومة مبيدات الحشرات في نواقل الملاريا (GPIRM) (6) والتي عرضت إطاراً شاملاً للعمل في خمس مجالات رئيسية (أو "دعائم"):

- أ. تخطيط وتنفيذ استراتيجيات وطنية لإدارة مقاومة مبيد الحشرات.
- ب. ضمان المراقبة الحشرية ومراقبة الحساسية والإدارة الفعالة للمعطيات.
- ج. تطوير أدوات جديدة مبتكرة لمكافحة الناقل.
- د. ملء الفجوات المعرفية المتعلقة بآليات المقاومة وأثر الأساليب الحالية لإدارة مقاومة مبيدات الحشرات.
- هـ. تمكين الآليات من تحسين التبشير وبناء الموارد البشرية والمالية.

الخطة العالمية لإدارة مقاومة مبيدات الحشرات في نواقل الملاريا واضحة لا لبس فيها حول ضرورة تكثيف جهود مراقبة مقاومة مبيدات الحشرات؛ وتدعو لتنظيم أكبر لهذا العمل ضمن البرامج الوطنية لمكافحة الملاريا. وعلى نحو خاص: يجب أن تتعامل خطط المراقبة، وبوتيرة متزايدة، مع الحاجة لمعطيات أكثر تفصيلاً حول: توزعات أنواع الناقل وصفاتها ذات الصلة

1 للاطلاع على قائمة حديثة من مبيدات الحشرات الموصى بها من منظمة الصحة العالمية راجع الموقع الإلكتروني مخطط منظمة الصحة العالمية لتقييم مبيدات الهوام <http://www.who.int/whopes/en>

الإطار 1.1

آليات مقاومة مبيدات الحشرات: مقتضيات لبرامج مكافحة الناقل

تتعقد إدارة مقاومة مبيدات الحشرات بحقيقة أن: المقاومة تأخذ عدداً من الأشكال. يمكن تقسيم آليات المقاومة إلى مجموعتين: مقاومة استقلابية، ومقاومة الموقع المستهدف.

تنشأ المقاومة الاستقلابية بسبب التغييرات في أنظمة إنزيمية للبعوض تؤدي إلى إزالة سمية أكثر سرعة لمبيد الحشرات مما في الحالة السوية، مما يمنع مبيد الحشرات من الوصول إلى موقع فعله المقصود. في حالة نواقل الملاريا: يعتقد أن هناك ثلاثة أنظمة إنزيمية مهمة: مجموعة الإستيراز *esterases*، مجموعة أحادي الأكسجيناز *mono-oxygenases*، ومجموعة ناقلة *s-glutathione S-transferases*.

تحدث مقاومة الموقع المستهدف عندما تبدل المستقبلية البروتينية التي صمم مبيد الحشرات ليهاجمها نتيجة طفرة: لا يمكن لمبيد الحشرات بعد حدوث ذلك أن يرتبط بالموقع المستهدف المقصود من المستقبلية، وبذلك لا تتأثر الحشرة -أو تتأثر بدرجة أقل- بمبيد الحشرات. تحدث الطفرة في مستقبلات قناة الصوديوم في حالة *د.د.ت* والبيريثرويد، مما يسمح لما يوصف بمقاومة الصرع "*knockdown resistance*". وتحدث الطفرة في البروتين: أسيتيل كولين إستيراز (ناقل عصبي) في حالة مركبات الفسفات العضوية والكاربامات، مما يسمح لما يشار إليه بمقاومة *Ace-1*.

ظهر تعقيد آخر بسبب المقاومة المتصالبة بين الأصناف المختلفة من مبيدات الحشرات التي تتشارك الأسلوب نفسه من الفعل. وبذلك، من المحتمل أن تكون النواقل المقاومة للبيريثرويد، بسبب امتلاكها الجين المقاوم للصرع ستكون مقاومة لـ *د.د.ت* أيضاً. وبطريقة مماثلة: يمكن للطفرة *Ace-1* أن تسمح بمقاومة الموقع المستهدف لمبيدات الحشرات من الكاربامات والفسفات العضوية. سيقيد وجود مقاومة متصالبة اختبار مبيدات حشرية بديلة في الحالات التي تكتشف فيها المقاومة.

إلا أن أثر الانتشار الملاحظ للمقاومة، والوجود المتزايد لجينات مقاومة الصرع على وجه الخصوص، على فعالية البرامج الحالية لمكافحة الناقل، غير مؤكد. وقدمت الدراسات الحالية بينات متضاربة: فبعضها بين أن مقاومة الصرع لا تنقص مستوى التحصين الممنوح بالشبكات المعالجة بمبيد الحشرات؛ في حين ذكرت دراسات أخرى ميزة ملائمة للأهماط الظاهرية المقاومة للصرع، وهناك تقرير واحد على الأقل حول نقص نجاعة الشبكات المعالجة بمبيد الحشرات في منطقة من مقاومة البيريثرويد.

أجمعت الآراء على أن من غير المحتمل - بناء على البيانات الحالية - أن وجود جين مقاوم سيجعل الاستراتيجيات الحالية لمكافحة الناقل غير فعالة فجأة. ومع ذلك، يبقى احتمال أن تهدد المقاومة المستجدة متانة وقوة المداخلات المرتكزة على البيريثرويد (الشبكات المبيدة للحشرات المديدة البقاء، والرش الشمالي داخل المباني) على المدى الطويل. لذلك، فالسبيل الحكيم للتصرف هو تبني أسلوب استباقي وتعديل الممارسات الحالية بحيث تؤخر انتشار المقاومة، وتحافظ على الأقل على فعالية مبيدات الحشرات الحالية، حتى يتم تطوير أصناف جديدة من مبيدات الحشرات أو الأدوات الجديدة.
المصدر: المرجع (5).

(مثل تفضيلات اللدغ والاستراحة)، حالة مقاومة مبيدات الحشرات المستخدمة حالياً عند كل نوع من الناقل، جودة ونجاعة مداخلات مكافحة الناقل. بدت الدراسات الوبائية التي تقدر المقتضيات الإجرائية للأهماط المختلفة من المقاومة جزءاً حيوياً من الأساس المعرفي المتوسع والمطلوب حالياً، وبشكل فوري، لتوجيه استعمال مبيدات الحشرات، وتطوير استراتيجيات لإدارة مقاومة مبيدات الحشرات كجزء من برامج مكافحة الملاريا والأمراض الأخرى المنقولة بناقل (6).

لدى منظمة الصحة العالمية تقليد قديم وهو توفير الدعم للبلدان في مراقبة مقاومة مبيدات الحشرات وإدارتها. ويبقى هذا أحد الوظائف الرئيسية لبرنامج الملاريا العالمي. عملت منظمة الصحة العالمية على أن تكون المنسق العالمي للمعلومات حول مقاومة الناقل لأكثر من 50 سنة، مزودة الدول الأعضاء بنصائح وإرشادات حديثة وبانتظام حول مراقبة مقاومة مبيدات الحشرات وإدارتها حالما تتطور. وكجزء من هذا الدور، ولضمان إمكانية مقارنة معطيات مقاومة مبيدات الحشرات من مختلف البلدان والمصادر، فقد طورت منظمة الصحة العالمية إجراءات اختبار معيارية ومعايير عمليات اكتشاف مقاومة مبيدات الحشرات ومراقبتها في نطاق نواقل الأمراض- بما في ذلك البعوض. كما كان التزويد بمجموعة أدوات اختبار الحساسية المضمونة الجودة للاستخدام في الميدان مكوناً رئيساً من عمل منظمة الصحة العالمية في هذا المجال (7).

ونشرت - على مدى سنوات - سلسلة من الدلائل الإرشادية والتعليمات لإجراء اختبار وجود مقاومة مبيدات الحشرات باستخدام تقنية مقيسة بيولوجية معيارية في البعوض البالغ في حالة نواقل الملاريا (8، 9، 10). عكست التحديثات المتعاقبة للدلائل الإرشادية تطورات في استراتيجيات مكافحة الملاريا، وبشكل خاص إدخال أصناف جديدة من مبيدات الحشرات في برامج الصحة العمومية. يغطي الإصدار الأخير من هذه الدلائل الإرشادية المنشور عام 1998 الأصناف الرئيسية الأربعة كلها من مبيدات الحشرات المتوفرة في الاستخدام الروتيني لمبيدات الحشرات وهي: الكلور العضوي، الفسفات العضوية، الكاربامات، البيريثرويد (10). وتتضمن هذه الوثيقة أيضاً إرشادات حول تقدير النجاعة البيولوجية لمبيدات الحشرات عندما تطبق على السطوح (مثلاً: جدران المنازل والمواد المعالجة بمبيدات الحشرات مثل شبكات البعوض والستائر).

ركز الاهتمام مرة أخرى على ضرورة تشديد مراقبة مقاومة المبيدات وذلك نتيجة للبيانات المتنامية حول بزوغ المقاومة بين نواقل الملاريا وخاصة للبيريثرويد، والرغبة بعدم تقويض المكتسبات الحالية في المعركة ضد الملاريا. وقد عززت ذلك الدعوات لتحديث الدلائل الإرشادية لعام 1998 لتؤكد، على نحو رئيسي، على أن جهود المراقبة المستقبلية متماشية بشكل أفضل مع المعلومات المطلوبة المذكورة في الخطة العالمية لإدارة مقاومة مبيدات الحشرات في نواقل الملاريا.

2. تطور اختبار الحساسية بحسب منظمة الصحة العالمية: ملاسات النسخة المنقحة الحالية

المقاييس البيولوجية لحساسية مبيدات الحشرات بحسب منظمة الصحة العالمية - والتي هي موضوع هذه الدلائل الإرشادية المنقحة - هي اختبار بسيط مباشر لاختبار الاستجابة للتعرض. يُعرض البعوض لتراكيز معروفة من مبيد للحشرات لفترة ثابتة من الزمن يسجل في نهايتها عدد الإماتات في الحشرات. وصمم الاختبار في شكله الحالي للتفريق بين حساسية القيمة القاعدية والمقاومة لمبيدات الحشرات في البعوض البالغ. والاختبار معد ليستخدم كأداة ترصد ميداني ومختبري؛ والقصد من الاختبار أن يوفر معلومات قليلة حول الطُرز والآليات الأساسية التي أدت إلى المقاومة عند اكتشافها.

تغيرت معدات الاختبار ومنهجيته على نحو قليل نسبياً منذ أن أوصت منظمة الصحة العالمية باستخدام تقنية المقاييس البيولوجية المعيارية للمرة الأولى لكشف مقاومة مبيدات الحشرات في أوائل ستينات القرن العشرين (11). وكانت التغيرات التي أجريت على المنهجيات خلال السنوات قليلة إلى حد ما، ومرتبطة ارتباطاً كبيراً بشروط الاختبار وبروتوكول اختيار عينة الحشرات (8، 9، 10).

برز الدافع للنسخة المنقحة الحالية من توصيات مشاوره غير رسمية عقدت في مايو 2010 من قبل منظمة الصحة العالمية لمراجعة الحالة الحالية لمقاومة مبيدات الحشرات في نواقل الملاريا والتعرف على الاستراتيجيات لتأخير بزوغ المقاومة. وتوصلت المشاورة غير الرسمية إلى توصيات عديدة فيما يتعلق بالتوجه المستقبلي لاكتشاف مقاومة مبيدات الحشرات ومراقبتها، مدركة الدور المركزي لمراقبة مقاومة مبيدات الحشرات في نجاح مكافحة الناقل. وإضافة إلى تسليط الضوء على الحاجة إلى توسيع النطاق في اختبار الحساسية فوراً، أوصى الخبراء المشاركون في المشاورة بتوطيد آليات للتبليغ لضمان جمع ومقارنة واسترجاع المعطيات المتعلقة بالمقاومة ضمن عملية صنع القرار؛ وذلك لجعل مكافحة الناقل أقل من «حجم واحد يناسب الجميع» وأكثر استجابة للوضع المحلي (5).

وقد أوصت أنه يجب الاستمرار بجعل اختبارات الحساسية المعيارية بحسب منظمة الصحة العالمية الطريقة الرئيسية لاكتشاف المقاومة والتعرف عليها. وقد راعت ضرورة تحديث الدلائل الإرشادية الحالية لمراقبة المقاومة (10) لكي تعكس الأولويات الجديدة والحاجة للمعلومات، ولاسيما لتسليط الضوء على الحاجة للتعرف الدقيق على أنواع كل البعوض الذي يجري اختباره؛ وبالتالي شُكلت مجموعة عمل من جماعة من المشاركين في الاجتماع لكي تقوم بهذه المهمة. وحُدِدت الأغراض النوعية لمجموعة العمل المكلفة بتحديث الدلائل الإرشادية لمقاومة مبيدات الحشرات كالتالي:

- توفير آخر المعلومات حول إجراءات اختبار مراقبة مقاومة مبيدات الحشرات في نواقل الملاريا بحسب منظمة الصحة العالمية لتتماشى مع التطورات الحديثة في إدارة مقاومة الناقل.
- توفير قائمة حديثة «لجرات التمييز» للبعوض البالغ لكل مبيدات الحشرات المستخدمة، سواء في مكافحة ناقل الملاريا أو لغايات بحثية.
- وفي سياق تفسير نتائج اختبار الحساسية بحسب منظمة الصحة العالمية: تنقيح تعريف «المقاومة» التي تطلب فعلاً استباقياً من قبل برامج مكافحة الوطنية لإدارة مقاومة مبيدات الحشرات.
- التعرف على آليات عملية التبليغ عن معطيات مقاومة مبيدات الحشرات والمقارنة والتفسير، والتي تضمن استخدام المعطيات لتتوير خطط إدارة المقاومة واستراتيجيتها.

أوصى الخبراء في المشاورة غير الرسمية بأن تُستكمل مراقبة الحساسية الروتينية بالمقاييس البيولوجية لمنظمة الصحة العالمية باستخدام اختبار جيني إضافي، وبدرجة أقل باختبار كيميائي بيولوجي، وذلك لأن مقاومة مبيدات الحشرات يجب أن تكون موصوفة بمصطلحات جينية. وإن طرق الاختبار المكمل لتحديد الآليات الأساسية للمقاومة والأدوات اللازمة لتتبع سرعة المقاومة مهمة في اتخاذ قرار إدارة مقاومة مبيدات الحشرات على المستوى الوطني.

لاحظ أن الدلائل الإرشادية وإجراءات الاختبار الخاصة بإجراء الاختبار الحيواني والمختبري لمبيدات يرقات البعوض متوفرة أيضاً. وطالما أن الدلائل الإرشادية لاختبار مبيد اليرقات ما زالت تعتبر موثوقة، وكانت موضوع مراجعة أكثر حداثة (في 2005) فإنها لم تكرر في الوثيقة الحالية. ويُنصح المهتمون بمبيدات اليرقات وتقييمها بالعودة إلى الوثائق الأصلية المتوفرة من منظمة الصحة العالمية (12، 13). ومن الجدير بالملاحظة أيضاً أنه قد ذكر، باختصار، طريقة مكتملة للاختبار الميداني لمقاومة مبيدات الحشرات، المقايسة القارورية bottle assay المطوّرة من قبل مراكز مكافحة الأمراض والوقاية منها في الولايات المتحدة (انظر القسم 6).

3. اختبار حساسية البعوض البالغ بحسب منظمة الصحة العالمية

المقاييس البيولوجية للحساسية بحسب منظمة الصحة العالمية هي، كما دُكر سابقاً، اختبار الاستجابة للتعرض المباشر؛ يقيس معدل موت البعوض من جرعة معيارية معروفة من مبيد حشرات معين (أي تركيز التمييز أو التركيز التشخيصي). وقد لخصت إجراءات الاختبار نفسه في الإطار 1.3.

1.3 تراكيز التمييز

إن مفهوم تراكيز (أو جرعات) التمييز **discriminating** أو التراكيز التشخيصية **diagnostic** مفهوم مستقر الآن؛ وقد تم تبنيه على نطاق واسع في مراقبة مقاومة مبيدات الحشرات في البعوض وناقل الأمراض الأخرى (10، 14، 15). وتم شرح استخدام تراكيز التمييز في المراقبة الروتينية للمقاومة بتفصيل أكثر في الإطار 3.2.

وقد استقرت تراكيز التمييز في الشروط المختبرية المعيارية لكل مبيدات الحشرات المستخدمة حالياً في برامج مكافحة الملاريا. وقد دُكرت في إصدارات سابقة من هذه الدلائل الإرشادية (8، 9، 10)؛ وتم تحديثها مرة ثانية في هذه النسخة المنقحة. وتم تضمين تراكيز التمييز لعدد من مبيدات الحشرات البيروثرويدية للمرة الأولى في الدلائل الإرشادية عام 1998، وكانت موضوع دراسة متعددة المراكز اكتنفت 9 معاهد (9). كانت أنواع الأنوفيلة المستخدمة في الدراسة هي: الأنوفيلة البيشية *Anopheles aconites*، الأنوفيلة البيضاء الأرجل *An. albimanus* والعربية *An. arabiensis* والفضيعة *An. dirus* والفريبورنية *An. freeborni* والغامبية *An. gambiae* والمبقعة *An. maculatus* والصغيرة *An. minimus* والاصطفائية *An. stephensi*.

وقد استقرت تراكيز التمييز منذ ذلك الحين لأربع مبيدات حشرات أخرى، رغم أنها غير نهائية حتى الآن وفي انتظار التأكيد من قبل مخطط منظمة الصحة العالمية لتقييم مبيدات الهوام (WHOPES). وبالنسبة لبعض مبيدات الحشرات الأحدث ذات الفعل الأبطأ مثل الكلورفينابير *chlorfenapyr*: من المرجح أن تستند تراكيز التمييز على فترات مسك أطول (مثلاً: 48 ساعة أو 72 ساعة بدلاً من 24 ساعة) (16).

وقد تم توفير أوراق مشربة مسبقاً بمبيد حشرات بتراكيز تشخيصية ملائمة كجزء من مجموعة أدوات الاختبار من قبل منظمة الصحة العالمية (انظر القسم 3.2.3 أيضاً). وتحدد منظمة الصحة العالمية تقليدياً تراكيزها المميزة بإحدى طريقتين - لتتأكد من أن كل البعوض الحساس قد قتل - وهاتان الطريقتان هما إما:

- ضعف التركيز الأخفض الذي أدى إلى معدل موت 100 % بشكل منهجي بعد التعرض بـ 60 دقيقة وفترة مسك مدتها 24 ساعة على ذرية حساسة أو جمهرة حساسة؛
- ضعف قيمة الجرعة المميتة $LC_{99.9}$ حسبما حدد باختبار الحساسية للقيمة القاعدية لذرية حساسة أو جمهرة حساسة.

يبين الجدول 3.1 تراكيز التمييز الموصى بها من منظمة الصحة العالمية لمبيدات الحشرات المستخدمة في مكافحة الملاريا أو لغايات بحثية (مثل الديلدرين *dieldrin*) لناقل الملاريا البالغ.

2.3 المعدات والتجهيزات

1.2.3 المشتريات

تحضر مجموعة أدوات الاختبار والأوراق المشربة بمبيد الحشرات من قبل جامعة Sains Malaysia في بينانغ بماليزيا لصالح منظمة الصحة العالمية. إجراءات وشروط مشتريات مجموعة أدوات الاختبار والأوراق المشربة منصوص عنها في وثيقة منظمة الصحة العالمية: تجهيزات مراقبة مقاومة مبيدات الحشرات في نواقل الأمراض. الإجراءات والشروط (7). يمكن طلب كل البنود المتضمنة كجزء من مجموعة أدوات الاختبار، بما في ذلك الأوراق المشربة، بشكل منفصل. التعليمات الكاملة لإجراء اختبار الحساسية متضمنة كجزء من العتيدة مع نسخ متعددة من استمارات تسجيل المعطيات الموصى بها، وهي مرفقة بهذه الوثيقة على شكل الملحقين 1، 2.

الإطار 3.1

قياس حساسية البعوض البالغ لمبيدات الحشرات : إجراء اختبار المقايسة البيولوجية بحسب منظمة الصحة العالمية

1. تلف ست صفحات من ورق أبيض نظيف (15x12سم) على شكل أسطوانة وتدخّل في ست أنابيب للمسك (واحدة في كل أنبوب) وتثبت في المكان مملقظ نابض سلكي من الفولاذ. تربط الأنابيب بالشرائح المنزلفة.
2. يشفط 120 - 150 بعوضة أنثى نشيطة على الأقل (على دفعات) من قفص للبعوض ضمن أنابيب المسك الستة من خلال ثقب الملاء في الشريحة المنزلفة لتشكيل ست عينات متكررة (نسخ replicate) من 20-25 بعوضة في كل أنبوب.
3. تغلق وحدة الشريحة المنزلفة حالما يتم نقل البعوض، وتوضع أنابيب المسك بوضعية قائمة لمدة ساعة. وفي نهاية هذا الوقت يتم التخلص من أي حشرات متضررة.
4. تحضر ست أنابيب تعرّض exposure بنفس الطريقة إلى حد كبير. يبطن كل أنبوب من أنابيب التعرض الأربعة المنقطة بالأحمر بلوح من الورق المشرب بمبيد الحشرات، في حين يبطن أنبوبا الشاهد المنقطان بالأصفر بورق مشرب بالزيت. يثبت كل منها في موضعه بمشبك نابض سلكي نحاسي.
5. تربط أنابيب التعرض الفارغة إلى الموضع الشاغر على الشرائح المنزلفة. وينفخ البعوض بلطف إلى داخل أنابيب التعرض ووحدة الشريحة المنزلفة مفتوحة، وعندما يصبح كل البعوض في أنابيب التعرض تغلق وحدة الشريحة المنزلفة؛ ويمكن فصل أنابيب المسك أو وضعها جانبا.
6. يحفظ البعوض في أنابيب التعرض والموضوعة بوضع أفقي، والطرف ذو الحاجز الشبكي إلى الأعلى لمدة ساعة (60 دقيقة).
7. في نهاية ساعة التعرض ينقل البعوض ثانية إلى أنابيب المسك بعكس الإجراء المذكور في الخطوة 5. تفصل أنابيب التعرض عن وحدات الشرائح المنزلفة. توضع قطعة من القطن المنقوع في ماء محلي على الطرف ذي الحاجز الشبكي لأنابيب المسك.
8. يبقى البعوض في أنابيب المسك مدة 24 ساعة (فترة الشفاء) وخلال هذا الوقت من الضروري حفظ أنابيب المسك في مكان ظليل محمي بعيداً عن حدي درجات الحرارة (المحشرة هي المكان المثالي). يجب تسجيل درجة الحرارة والرطوبة خلال فترة الشفاء.
9. يعد عدد البعوض المبيت ويسجل في نهاية فترة الشفاء (أي 24 ساعة بعد التعرض). تعتبر البعوضة البالغة حية إن كانت قادرة على الطيران بغض النظر عن عدد السيقان المتبقية. يعتبر أي بعوض مصروع knockdown - سواء فقد سيقانه أو أجنحته أم لا - محتضراً، ويحسب كميته.
10. عند إتمام اختبار الحساسية، قد ينقل البعوض إلى أنابيب إيبندورف Eppendorf منفصلة وموسومة بشكل واضح (فاصلة البعوض الميت والحي ضمن أنابيب منفصلة) للتخزين حتى الوقت الذي يمكن نقلها فيه إلى مرافق مناسبة للتعرف على الأنواع والاختبارات المكتملة عند الضرورة.

الإطار 3.2

استخدام تراكيز التمييز

من الضروري أولاً - لاستقصاء المقاومة في جماهر الناقل - الحصول على معطيات القيمة القاعدية للحساسية لكل مبيدات الحشرات على حدة في جمهرة سوية أو حساسة من نوع معين (الجمهرة الحساسة هي تلك التي لم تخضع لضبط مبيدات الحشرات والتي يكون وجود أفراد مقاومين فيها قليلاً أو معدوماً). ويتم تحقيق ذلك بتعرض نواقل غير مقاومة لسلسلة من التراكيز من مبيد حشرات معين (أو لتعرضات زمنية متسلسلة بتركيز مفرد) ، واختطاط النسبة المئوية للموت مقابل التعرض على ورقة الاحتمالية اللوغارتمية بهدف تقدير الجرعات المطلوبة لإحداث مستويات مختلفة من القتل (بشكل بديل: يمكن القيام بهذا الحساب باستخدام نموذج إحصائي للوحدة الاحتمالية اللوغارتمية). وبهذه الطريقة : من الممكن أن نحصل على التركيز الموافق لمعدل موت 99.9% (قيمة الجرعة المميّزة $LC_{99.9}$). هناك احتمال عال جداً عند هذا التركيز بأن كل الأفراد في جمهرة حساسية سوف يقتل. يعرف هذا التركيز تقليدياً بتركيز التمييز أو التركيز التشخيصي.

من غير الضروري - بعد توطيد تراكيز تمييز لمبيدات حشرات مستقلة تحت ظروف مختبرية معيارية باستخدام ذراري أو جماهر حساسة معروفة لنطاق من أنواع البعوض الناقل، إجراء اختبار الحساسية لغايات المراقبة الروتينية على المجال الكامل للتعرضات؛ حيث يكفي إجراء اختبار مقاومة بمقاييس بيولوجية معيارية باستخدام التركيز التشخيصي فقط، لأن أي ناجي survivor في هذا التركيز قد يعتبر مقاوماً. لهذا الأسلوب مزايا واضحة فيما يتعلق بتكلفة الاختبار ومردوديته.

من المهم معرفة أنه - من أجل أنواع البعوض التي لا تراقب روتينياً و/ أو في أوضاع جديدة حيث لا تتوفر معطيات القيمة القاعدية - من المهم توطيد حساسية القيمة القاعدية أولاً حسبما ذكر أعلاه (7).

2.2.3 تركيب مجموعة أدوات الاختبار

عدل تركيب مجموعة الأدوات المقدمة من جامعة Sains Malaysia في ماليزيا قليلاً كنتيجة للمراجعة الحالية لإجراءات مراقبة مقاومة مبيدات الحشرات ؛ وتبعاً لذلك فإن تركيب عتيدة الاختبار الموصى بها هي كالتالي:

■ 12 أنبوباً بلاستيكياً (بطول 125 مم و عرض 44 مم) مزوداً في إحدى نهايتيه بشاش قياس عيون شبكته 16، تتضمن الأنابيب الإثنا عشر:

- أربعة معلمة بنقطة حمراء للاستخدام كأنابيب تعرّض، أي لتعرض البعوض للورق المشرب بمبيد الحشرات
- أنبوبين معلمين بنقطة صفراء للاستخدام كأنابيب شاهدة لتعرض البعوض لورق شاهد معالج بالزيت (أي دون مبيد الحشرات).
- ست أنابيب معلمة بنقطة خضراء للاستخدام كأنابيب مسك للفرز قبل الاختبار والمشاهدة بعد التعرض.
- ست وحدات شرائح انزلاقية ، كل واحدة مزودة بغطاء لولبي على كلا الجانبين وبثقب للماء قطره 15 مم
- 40 صفحة من الورق التنظيف (15x12 سم) لتبطين أنابيب المسك
- 12 ملقطاً سلكياً بنابض، 6 من الفولاذ، 6 من النحاس، لمسك الورق في موضع أمام جدران الأنابيب، تستخدم الملاقط الفولاذية الستة مع أنابيب المسك المنقطة بالأخضر ، وتستخدم الملاقط النحاسية مع أنابيب التعرض المنقطة بالأحمر الأربعة وأنبوبي الشاهد المنقطتين بالأصفر.

الجدول 1.3

تراكيز التمييز لمبيدات الحشرات لبعوض الأنوفيلة البالغ¹

تركيز	مبيد الحشرات	صنف مبيدات الحشرات
4%	دديت	مركبات الكلور العضوي
4% و 0.4%	ديلدريين ^أ	
4%	مالاثيون	مركبات الفسفات العضوية
1%	فينيتروثيون ^ب	
0.25%	بيريميفوس ميثيل ^ج	
0.1%	بروبوكسور	مركبات الكاربامات
0.1%	بينديوكارب	
0.4%	كاربوسلفان ^د	
0.75%	بيرميثرين	مركبات البيريثرويد
0.05%	دلتاميثرين	
0.05%	لمبدا- سيهالوترين	
0.15%	سيفلوثرين	
0.5%	إيتوفينبروكس	
5%	كلورفينابير ^{هـ}	مركبات البيروول
2%	فيرونيل ^ز	مركبات الفينيل بيرازول

¹ يقتل التعرض للدليديرين عند 0.4% الأفراد الحساسين (ss) لكن لا يقتل الزيجوتات المتغايرة الألائل المقاومة (Rs) في حين يقتل التعرض للدليديرين عند 4% الزيجوتات المتغايرة الألائل (Rs) ولا يقتل الأفراد المقاومين المتماثلين الألائل (RR)

^ب التعرض لساعتين

^ج غير نهائي: يجب إثباته من قبل مخطط منظمة الصحة العالمية لتقييم مبيدات الهوام

^د اعتماداً على معطيات صناعية غير منشورة 2006

^{هـ} اعتماداً على معطيات منشورة من قبل N'Guessan وزملائه (2003) (17) و Alou وزملائه (2010) (18).

^و اعتماداً على معطيات منشورة من قبل Raghavendra وزملائه (2011) (16).

^ز اعتماداً على معطيات منشورة من قبل Kolaczinski & Curtis وزملائهما (2001) (19) و Brooke وزملائه (2000) (20).

المصدر : اعتماداً على المرجعين (10، 15) ما لم يذكر خلاف ذلك.

¹ هذه هي مبيدات الحشرات التي تحتاج لأن تختبر للمقاومة كلها أمكن ذلك، لكن لا يستلزم ذلك أنها موصى بها للاستخدام في مكافحة ناقل الملاريا.

- كأسين أو أنبوبي شفت بلاستيكيين بقطر داخلي 12 مم ، وطول الأنبوب 60 سم ، وقطعة فموية.
- لفة أو شريط بلاستيكي ذاتي الالتصاق
- ورقة تعليمات و 20 نسخة من نماذج التقارير

3.2.3 الأوراق المشربة بمبيد الحشرات

يبقى نطاق مبيدات الحشرات الذي تتوفر منه أوراق اختبار مشربة ، دون تغيير في الوقت الراهن في انتظار إثبات تراكم التمييز لمبيدات هوام أخرى. انظر القسم 3.1. ذكرت الأوراق المشربة بمبيدات الحشرات الإحدى عشر المتوفرة حالياً لتطلب من منظمة الصحة العالمية في الجدول 3.2، مع تفاصيل عن الأوراق الشاهد المرافقة لتستخدم مع كل مبيدات الحشرات. تتوفر الأوراق المشربة بمبيدات الحشرات في صناديق بلاستيكية، يحتوي كل صندوق 8 أوراق.

كما تتوفر أوراق مشربة بمبيدات حشرات بتراكيز أخرى، أي تراكيز متسلسلة حسب الطلب من جامعة Sains Malaysia. وقد صممت للاستخدام في حالات يكون فيها من الضروري توطيد القيمة للحساسية القاعدية لنوع أو جمهرة من البعوض لمبيد حشرات معين.

3.3 مراسم الاعتيان

1.3.3 انتقاء نماذج الاختبار

عمر البعوض والحالة الفيزيولوجية له والجنس/النوع (ذكر-أثني) gender عوامل يمكن أن تؤثر على نتيجة اختبارات الحساسية. لا يوصى باستخدام الذكور لمراقبة المقاومة لأنها أصغر وأكثر ضعفاً من الإناث؛ ولذلك يميل لأن يكون لها معدل موت شاهد أعلى. لهذا السبب يجري اختبار الحساسية على إناث البعوض فقط.

أظهرت الدراسات باستخدام إناث البعوض البالغ، وبشكل متكرر، أن كلاً من العمر والحالة الفيزيولوجية (أي غير مقتاتة، أو مقتاتة على الدم، حاملة جزئياً، حامل) لها أثر ملحوظ على الحساسية لمبيد الحشرات. على سبيل المثال: شوهد أن البعوض المسن أقل مقاومة لمبيدات الحشرات أحياناً، وخاصة عندما تمنح المقاومة عبر وجود إنزيم مزيل للسمية، والذي ينزع نشاطه للانحدار مع العمر (4، 20)؛ وبالتالي: يوصى بإجراء اختبارات الحساسية على إناث غير مقتاتة بالدم، وبعمر لا يزيد عن 3-5 أيام بعد النشوء (الانباتق).

من أجل الحصول على نتائج معيارية حسب العمر: يوصى بأن تنجز اختبارات الحساسية باستخدام الإناث البالغات والمأخوذة من تجميعات collections اليرقات (وهو الخيار الأفضل)؛ أو - إن لم تكن هذه التجميعات متوفرة - من نسل الجيل الأول من إناث البعوض الممسوكة من البر. إذا استخدمت تجميعات اليرقات: قد يتم تجميع عينات من نفس المكان ونفس موقع التكاثر قبل إجراء الاختبار لتوفير عدد كاف من البعوض الخاضع للاختبار. على كل، يجب أن تتم تجميعات اليرقات في الحالة المثالية من عدد من مواقع sites التكاثر المختلفة لتجنب اعتيان البعوض من دفعات batches بيضة واحدة، والتي قد تؤدي إلى نسبة كبيرة من الأشقاء siblings في جمهرة الاختبار. ولما كان تغير النمط الجيني للنسل لأثنى بالغة واحدة محدود أيضاً، فيجب أن تجمع الإناث الممسوكة من البر، وبطريقة مثالية، من عدد من المواضع locations المختلفة، وذلك لضمان الحصول على عينة ممثلة تماماً للجمهرة المحلية. وهذا يعني عملياً أنه يجب حصد 30 دفعة من البيض على الأقل، وأكثر من ذلك إن كان هناك مزيج من الأنواع من الإناث الممسوكة من البر، وحرصاً عليها.

عند الاعتماد على تجميعات اليرقات لتوفير إناث بالغات شباب لمراقبة المقاومة، من المهم تسجيل نمط موقع التكاثر (حقول الأرز، تجمعات مياه الأمطار، قناة ري، بئر) الذي شكلت من تجميعة اليرقات. هناك عدة أسباب لذلك، الأول: سوف يختلف التعرض لثمالات مبيد الهوام حسب نمط موقع التكاثر. الثاني: سوف تتميز بعض الأصناف taxa ضمن مركب النوع نفسه

بين مواقع التكاثر بشكل تفضيلي. على سبيل المثال: من المرجح أكثر أن يتكاثر الشكل الجزيئي M من الأنوفيلة الغامبية في حقول الأرز، في حين ينزع الشكل الجزيئي S ليسود في تجمعات مياه الأمطار.

خيار ثالث ، لكنه الأقل تفضيلاً، هو استخدام إناث ممسوكة من البر بشكل مباشر. في هذه الحالة : من الضروري تسجيل الحالة الفيزيولوجية للبالغات قبل الاختبار (أي فيما إذا كانت غير مقتاتة، أو مقتاتة على الدم، حامل جزئياً أو حامل). ومن الممكن، عند الضرورة، الإبقاء على الإناث في ماء محلي حتى يحين وقت تنفيذ الاختبارات.

الميزة الرئيسية لاستخدام الإناث الممسوكة من البر مباشرة موضع خلاف. السيئة الرئيسية هو أن عمرها غير معروف والذي قد يؤدي إلى اختلاف أكبر في نتائج اختبار الحساسية (ومن المرجح أكثر إلى تقدير بخس [الاستخفاف underestimation] للمقاومة) اعتماداً على توزع النوع ومبيد الحشرات المستخدم (21). قورنت المزايا النسبية لاستخدام نسل الجيل الأول من الإناث الممسوكة من البر والإناث الممسوكة من البر مباشرة بتفصيل أكثر في الجدول 3.3.

2.3.3 تواتر إجراء اختبار الحساسية

لم تقدم الطبقات السابقة من هذه الدلائل الإرشادية توصيات خاصة فيما يتعلق بتوقيت وتواتر إجراء اختبار الحساسية. لكنها لاحظت أن مقارنات معطيات الاختبار من موقع مفرد خلال الوقت مفيدة من وجهة نظر تقدير النزعات المؤقتة في المقاومة. توفر مقارنات معطيات الاختبار من مواقع متعددة معلومات مفيدة حول التوزع الجغرافي للمقاومة.

لوحظ أن تواترات المقاومة وانتشار آليات المقاومة وتوزع جماهر الأصناف المختلفة في موقع مفرد تختلف بشكل ملحوظ مع الزمن. ولذلك، فالتوصية الحالية هي أن يتم اختبار حساسية الناقل للأصناف الأربعة كلها من مبيدات الحشرات المعتمدة من منظمة الصحة العالمية - بأوقات مختلفة عديدة طوال السنة بالتزامن مع تغيير الفصول و/أو مواعيد المحاصيل الزراعية. يقترح ما يلي كاستراتيجيات محتملة، مع الأخذ بعين الاعتبار توقيت إجراء اختبار الحساسية وتواتره:

- من الممكن إجراء مراقبة مقاومة مبيدات الحشرات عبر شبكة من المواقع الخافرة، بحيث تختار هذه المواقع لتمثل نطاق المناطق الإيكولوجية وشدة سراية الملاريا التي تحدث ضمن بلد معين لكي تحدد توزع المقاومة.
- من الممكن إعادة الاختبار في المواقع نفسها لكي تراقب التغيرات في حساسية البعوض مع الوقت اعتماداً على حجم جمهرة الناقل.

■ قد تتطلب الأماكن التي تستخدم فيها نفس مبيدات الحشرات، لكل من مكافحة الناقل ولغايات زراعية، جدول مراقبة أكثر صرامة بسبب احتمال الضغط الانتقائي الإضافي على جماهر الناقل من الاستخدام الزراعي.

3.3.3 حجم العينة

نحتاج حوالي 150 أنثى بعوض بالغة لإجراء مجموعة واحدة من اختبارات المقايسة البيولوجية حسب منظمة الصحة العالمية، سوف يعرض 100 منها لمبيد الحشرات الذي سيختبر (في 4 نسخ replicates كل منها حوالي 25 بعوضة). سوف تخدم الخمسون الباقية كشواهد (أي نسختان في كل منها حوالي 25 بعوضة). إذا اختبر أكثر من مبيد للحشرات فسوف نحتاج دفعات إضافية من 150 بعوضة (لكل مبيد حشرات).

الجدول 2.3

توافر أوراق الاختبار المشربة بمبيد الحشرات للمراقبة الروتينية لمقاومة مبيدات الحشرات

حتى 31 / 12 / 2012

الورق الشاهد	تركيز التمييز	صنف مبيد الحشرات / مبيد الحشرات
مركبات الكلور العضوي		
زيت الريزيلا	4% و 0.4%	ديلدرين
زيت الريزيلا	4%	ددت
مركبات الفسففات العضوية		
زيت الزيتون	5%	ملاثيون
زيت الزيتون	1%	فينيثروثيون
مركبات الكاربامات		
زيت الزيتون	0.1%	بروبوكسور
زيت الزيتون	0.1%	بنديوكارب
مركبات البيريثرويد		
زيت السيليكون	0.75%	بيرميثرين
زيت السيليكون	0.05%	دلتا ميثرين
زيت السيليكون	0.05%	لمبادا سيهاوثرين
زيت السيليكون	0.15%	سيفلوثرين
زيت السيليكون	0.5%	إيتوفينبروكس

يعرض البعوض الشاهد إلى أوراق مشربة بالزيت الحامل المناسب فقط. أي دون مبيد حشرات (انظر الجدول 2.3). يعالج البعوض الشاهد في كل النواحي الأخرى بنفس الطريقة كما في البعوض المعرض، ويختبر بالتوازي وتحت نفس الظروف. الغاية من تضمين الشواهد هو توفير تقدير لمعدل الموت الطبيعي خلال الاختبار (انظر القسم 4-1)، ولحساب المتغيرات التي قد تحرض الموت غير مبيد الحشرات الذي يختبر. في هذه النسخة المنقحة: يوصى، وبشدة، بإجراء الاختبار باستخدام مجموعتين من الشواهد كحد أدنى (50 بعوضة) لتحسين الاعتداد significance الإحصائي للنتائج.

إن لم يكن ممكناً جمع العدد الكافي من البعوض في مناسبة واحدة (عند التعامل مع الإناث الممسوكة من البر على سبيل المثال) فمن الممكن تخزين البعوض الحي حتى يتم جمع العدد الكافي. عند الاعتماد على العينات المجمعة: يجب أن يزود البعوض بإمكانية الوصول إلى وجبة سكرية إلى حين إجراء المقايسة البيولوجية.

عند الاشتباه بوجود مقاومة مبيدات الحشرات (أي هناك ناجين survivors في التركيز التشخيصي، انظر القسم 4-1) فسيكون من الضروري إجراء المزيد من الاختبارات للتعرف على الآليات الأساسية المسؤولة من المقاومة؛ ويمكن تحقيق ذلك باستخدام توليفة من المؤازر والطرق الجزيئية و/ أو الكيمائية البيولوجية .

الجدول 3.3

مزايا ومساوئ استخدام نسل الجيل الأول والإناث الممسوكة من البر لإجراء المقاييسات البيولوجية

عينات الناقل	المزايا	المساوئ
نسل الجيل الأول	<p>يمكن المحافظة على عمر النواقل ثابتاً بين الاختبارات، مما يسمح بمقارنة النتائج من أوقات وأماكن مختلفة.</p> <p>يمكن استخدامه في المناطق ذات الكثافة المنخفضة للبعوض حتى إن لم يكن ممكناً مسك أعداد كافية من إناث البعوض البالغ البرية.</p>	<p>يتطلب مرافق حشرية أفضل والتي تحد أين يمكن إجراء الاختبار.</p> <p>سوف تختلف الظروف البيئية عن تلك الموجودة في المحشرة.</p> <p>بما أنه يمكن لبيوض كثيرة أن تأتي من إناث بالغة قليلة فقط، فمن المرجح أن يكون عدد المجينات genomes المأخوذة كعينات من الجمهرة البرية أقل من عدد الحشرات المختبرة.</p>
الإناث الممسوكة من البر	<p>يحتاج مرافق (تسهيلات) أقل وبذلك يمكن تنفيذه في عدد أكبر من المواضيع.</p> <p>سوف تعكس التغيرات في الحساسية التغيرات في نجاعة المداخلة المشاهدة في الميدان بشكل أكثر وثاقفة.</p> <p>يجب أن يكون التوزيع العمري للنواقل ممثلاً لجمهرة الناقل البرية في وقت وموضع محددين.</p>	<p>سوف يختلف التوزيع العمري والحالة الفيزيولوجية للنواقل بين العينات منقصة إمكانية مقارنة النتائج.</p>

المصدر: المرجع (5)

وصفت هذه الأمط من الاختبار بشكل مختصر في الفصل 5 . نحتاج لبعوض حي نشيط للاختبارات الكيميائية البيولوجية، ولذلك قد يكون من الضروري جمع نماذج إضافية أو - عند استخدام تجميعات اليرقات - الاحتفاظ بعينة جزئية من البعوض الناشئ (انظر القسم 5-1).

4.3.3 التعرف على النوع:

تنزع أنواع عديدة من البعوض المنتمي إلى نفس المجموعة أو المعقد للوجود في توائف sympatry في الكثير من المناطق الموطونة بالملايا. على سبيل المثال: يتألف المركب النوعي للأنوفيلة الغامبية من أنواع يرقية cryptic عديدة: أنواع الأنوفيلة الغامبية والعربية والبوامبية bwambw والميلاسية melas والميرسية merus والرابعة الحلقات (B,A) quaddianmulatus وبعضها توالفي. تتضمن المركبات النوعية الأخرى: الأنوفيلة البعوضية الوجهه An.culicifacies. والأنوفيلة المشؤومة An.funestus. ليس بالضرورة أن تتشارك أعضاء مختلفة من نفس المركب النوعي آليات المقاومة نفسها، كما أنه ليس بالضرورة أن تبدي نفس أمهات مقاومة مبيد الحشرات، لذلك يجب أن تستعرف العينات التي تجمع من الحقل إلى مستوى النوع في المعاهد التي تتواجد أنواع مختلفة من البعوض مع بعض - كلما أمكن ذلك.

قد يكون من الممكن التعرف على أفراد معينين من مركبات نوعية قبل إجراء المقايسة البيولوجية على أساس المميزات المورفولوجية. على كل: جعل تطوير تقنيات جزيئية التفريق بين أفراد مستقلين من مركبات نوعية للبعوض ممكناً وسهلاً وبشكل سريع نسبياً باستخدام مقايسات بسيطة مرتكزة على تفاعل البوليمراز السلسلي PCR. وبهذه التقنية: يمكن القيام بالتعرف على النوع بعد المقايسة البيولوجية على النماذج الميتة. يجب خزن النماذج في هلام سليكوني أو في الايثانول قبل التعرف من خلال تفاعل البوليمراز السلسلي PCR. يمكن وضع البعوض بشكل منفرد في أنابيب إيبندروف سعة 0.5 مل عند الحاجة، وبهدف تجنب تلوث الدنا المتصالب.

ذكرت طرق مناسبة للتعرف على نواقل الملاريا إلى مستوى النوع في: طرق في بحوث الأنوفيلة. هذه الوثيقة متوفرة للتحميل من الموقع الإلكتروني التالي:

<http://www.mr4.org/Publications/MethodsInAnophelesResearch/tabid/336/Default.aspx>

يوصى بشدة أن يستعرف كل الناجين و 20% على الأقل من المقتولين، كحد أدنى، في اختبار مقايسة بيولوجية لمبيد حشرات معين إلى مستوى النوع.

4.3 شروط الاختبار ومراسمه

وصفت الخطوات المكتنفة في إجراء اختبار المقايسة البيولوجية بحسب منظمة الصحة العالمية سابقاً (انظر الإطار 1.3). وكما ذكر مسبقاً: بقي الإجراء الأساسي دون تغيير تقريباً منذ تمت التوصية بالطريقة للاستخدام كاختبار معياري للحساسية في العام 1976 (14). على كل: تم إجراء بعض التعديلات الطفيفة على مراسم الاختبار خلال السنوات، على سبيل المثال: اشترطت النسخة المنقحة 1998 - عندما تم تضمين البيريثرويد للمرة الأولى - ضرورة الاحتفاظ بأنابيب المسك بوضع عمودي خلال فترات التعرض والمسك (10)

في النسخة المنقحة الحالية: تم لفت الانتباه للأوجه التالية من إجراء الاختبار، حيث اقترحت تغييرات صغيرة على شروط الاختبار ومراسمه الموصى بها. لاحظ أن استمارة معطيات معيارية لتسجيل المعلومات المتعلقة باختبار الحساسية، بما في ذلك تفاصيل مجال الدراسة ومناذج الاختبار، وطريقة الجمع، والعمر، والحالة الفيزيولوجية، والنوع، ومبيد الحشرات (مبيدات الحشرات) الذي يتم اختباره (اختبارها) وشروط الاختبار، مذكورة في الملحق 1.

1.4.3 عدد الخاضعين للاختبار

كما ذكر سابقاً: يجب إجراء الاختبار على 100 بعوضة على الأقل من أجل أي مبيد للحشرات في التركيز التشخيصي مع 4 نسخ على الأقل في كل منها 20 - 25 بعوضة لكل اختبار. يمكن إجراء الاختبارات خلال أيام قليلة، عندما لا يكون اختبار هذا العدد ممكناً في يوم واحد، حتى يتم الوصول إلى هذا العدد. في هذه الحالة، ولتجنب التداولات المتعددة - يمكن إبقاء الأوراق

المشربة في الأنابيب، بشرط أن تلف (تغطي) برقاقة من الألمونيوم وتحفظ بدرجة 4° م بين الأنابيب المتعاقبة. لاحظ أنه يحدد اثنين من الشواهد كحد أدنى (50 بعوضة) في هذه النسخة المنقحة بهدف تحسين المصدوقية validity الإحصائية للنتائج.

2.4.3 شروط المحيط

أثبتت البحوث أنه يمكن لدرجة حرارة المحيط ambient أن تؤثر على سمية مبيدات الحشرات. وبشكل مشابه: تبين أن الرطوبة النسبية تؤثر على بقاء البعوض خلال فترة المسك. لذلك يوصى، كما في السابق، بضبط درجة الحرارة والرطوبة خلال فترات المسك والاختبار. يجب أن يجرى الاختبار بدرجة 25° م ± 2° م ورطوبة نسبية 80% ± 10% إن أمكن. يجب مراقبة كل من درجة الحرارة والرطوبة النسبية خلال فترة التعرض لمدة ساعة، وفترة المسك لمدة 24 ساعة اللاحقة؛ ويجب أن تسجل القيم الدنيا والعظمى في بداية فترة التعرض وفي نهاية فترة المسك لمدة 24 ساعة. من المحتمل أن تكون فترة المسك للكولورفينايير أطول.

يجب مسك أنابيب التعرض والمسك بوضعية عمودية طوال الاختبار (حتى تلك التي كان فيها لمبيدات الحشرات أثر صارع). يجب ألا تتجاوز درجة الحرارة 30° م. عند عدم وجود محشرة insectary أو صندوق بارد كمحشرة ميدانية: يجب وضع الأنابيب في موضع ظليل محمي، وتغطي النهاية الشبكية بقطعة من بطاقة؛ وسيساعد هذا في الحد من تماس البعوض مع النهايات الشبكية mesh لأنابيب التعرض والمسك.

3.4.3 الاستخدام المتعدد الأوراق المشربة

تنخفض نجاعة الأوراق المشربة مع عدد الاستخدامات وعدد البعوض الذي يتم اختباره (المفحوص)؛ وهذا صحيح بشكل خاص بالنسبة للأوراق المشربة بالبيريثرويد. التوصيات الحالية هي عدم استخدام ورقة مشربة بمبيد الحشرات لأكثر من 6 مرات، المساوي لتعرض حوالي 150 بعوضة. سمحت الإجراءات السابقة من هذه الدلائل الإرشادية بإعادة استخدام أكبر للأوراق المشربة بغير البيريثرويد (حتى 20 مرة). تبقى النصيحة المتعلقة بتخزين الأوراق بين الاختبارات، والقيود الزمنية حول استخدام الأوراق حالما تفتح كما هي.

4. تسجيل نتائج اختبار الحساسية والتبليغ عنها

1.4 حساب معدل الموت ومعدلات الصرع

لاحظ أن استمارة معيارية يمكن استخدامها لتسجيل نتائج المقاييسات البيولوجية والتبليغ عنها، والمتعلقة بكل من معدل الموت ومعدلات الصرع، ملحقه كملحق 2.

1.1.4 معدل الموت

يتم تقدير معدل الموت، أي عدد البعوض الميت، في كل من أنابيب التعرض وأنابيب الشاهد بعد التعرض بـ24 ساعة. يصنف البعوض كميته إن كان لا يتحرك أو غير قادر على الوقوف أو الطيران بطريقة متناسقة.

ينزع البعوض مع بعض مبيدات الحشرات، وبشكل أكثر لفتاً للنظر مع البيريثرويد، إلى فقد سيقانه بعد التعرض لمبيد الحشرات لعدة ساعات. يحسب البعوض على أنه حي إن بقي قادراً على الطيران في نهاية مدة الـ24 ساعة بعد التعرض، بغض النظر عن عدد السيقان المتبقية. يحسب البعوض على أنه ميت إذا صرع (أي احتضر) - سواء فقد سيقانه أو جناحيه؛ وهذا قد يبرر على أساس أن البعوضة في هذه الحالة ستمسك وتؤكل من قبل النمل والمفترسات predators في الحياة البرية.

يحسب معدل الموت في عينة اختبار بجمع عدد البعوض الميت خلال نسخ التعرض الأربعة جميعها، ويعبر عن ذلك كنسبة مئوية من العدد الإجمالي للبعوض الخاضع للتعرض.

$$\text{معدل الموت الملاحظ} = \frac{\text{العدد الإجمالي للبعوض الميت}}{\text{حجم العينة الإجمالي}} \times 100x$$

يجب القيام بحساب مشابه للحصول على قيمة لمعدل موت الشاهد. يجب نبذ الاختبارات إذا كان معدل موت الشاهد أعلى 20%. أما عندما يكون معدل موت الشاهد أكبر من 5%، لكنه أقل من 20%، فيجب تصحيح معدل الموت الملاحظ باستخدام معادلة أبوت، وهي:

$$100x \frac{(\% \text{معدل الموت الملاحظ} - \% \text{معدل موت الشاهد})}{100 - \% \text{معدل موت الشاهد}}$$

أما إذا كان معدل موت الشاهد أقل من 5% فيمكن تجاهله ولا داعي لأي تصحيح. يجب إعطاء حجم العينة عندما يبلغ عن عدّات counts معدل الموت، ويفضل بتقدير من 95% من فواصل الموثوقية confidence intervals.

2.1.4 معدل الصرع

البيريثرويد وددت مبيدات حشرات سريعة الفعل، ولها أثر صارع knock-down (انظر الإطار 1.1). تبين أن معدل الصرع مؤشّر حساس للاكتشاف المبكر للمقاومة عند اكتناف مقاومة الصرع.

تم القيام بمشاهدات لعدد البعوض المصروع خلال فترة التعرض على مدار الساعة. تعتبر البعوضة مصروعة إن كانت غير قادرة على الوقوف أو الطيران بطريقة متناسقة، وسوف تقع إلى قاع أنبوب التعرض عادة. يوصى أن تتم المشاهدات بفواصل منتظمة: بعد 10 و 15 و 20 و 30 و 40 و 50 و 60 دقيقة عادة خلال فترة التعرض، وأن تكون المشاهدة الأخيرة قبل النقل إلى أنبوب المشاهدة مباشرة. إذا كان معدل الصرع الملاحظ بعد 60 دقيقة أقل من 80% فيجب القيام بعدة مرة أخرى عند الدقيقة 80 للبعوض في أنبوب المشاهدة. قد تنقر حاوية المسك بضع مرات قبل القيام بهذا التحديد النهائي. يجب القيام بتسجيل الصرع بشكل أكثر تواتراً، كل 3 دقائق، في الجماهر الحساسة جداً.

من الممكن حساب معدلات الصرع لـ 50% من البعوض من عدّات الصرع الملاحظ ، إضافة إلى 95%، (ويُعتبر عنه بالصرع KD50 والصرع KD95 على التوالي)، إما بشكل ترسيمي باستخدام ورق وحدة الاحتمالية اللوغارتمية أو بالحاسوب باستخدام نموذج إحصائي للوحدة الاحتمالية الزمنية اللوغارتمية. ورغم أن حساب قيم KD50 و KD95 إجراء بسيط نسبياً، فإن هذه القياسات لا تستخدم على نطاق واسع للمراقبة الروتينية للحساسية لغايات إجرائية.

2.4 تفسير نتائج اختبار الحساسية

تمت مراجعة الإرشادات المتعلقة بتفسير نتائج المقاييس البيولوجية بحسب منظمة الصحة العالمية في ضوء المعرفة الجديدة والحاجة لفعل فوري لمعكسة انتشار المقاومة بين جماهير الناقل. التوصيات الحالية هي:

- يشير معدل الموت في نطاق 98% - 100% إلى الحساسية.
- يوحي معدل الموت الأقل من 98% بوجود مقاومة ، ويجب القيام بمزيد من الاستقصاءات.
- يجب توكيد وجود الجينات المقاومة في جمهرة الناقل إن كان معدل الموت الملاحظ (المصحح عند الضرورة) بين 90% و 97% . قد يتم الحصول على توكيد المقاومة بإنجاز اختبارات إضافية للمقاييس البيولوجية بنفس مبيد الحشرات على نفس الجمهرة أو على نسل أي بعوض بقي حياً (مجرأة تحت ظروف الحشرة) و/أو بإجراء مقاييس جزئية لآليات مقاومة معروفة. تثبت المقاومة عندما يبدي اختباران إضافيان على الأقل معدل موت أقل من 98%
- إذا كان معدل الموت أقل من 90%، قد لا يكون إثبات وجود جينات مقاومة في الجمهرة المختبرة بإجراء مقاييس بيولوجية إضافية ضرورياً، طالما أن الأختبار قد شمل 100 بعوضة كحد أدنى من كل نوع و على كل، يجب القيام بمزيد من الاستقصاءات حول آليات المقاومة وتوزعها.
- عندما تثبت المقاومة: يجب القيام بفعل وقائي pre-emptive لإدارة مقاومة مبيدات الحشرات ولضمان المحافظة على فعالية مبيدات الحشرات المستخدمة في مكافحة ناقل الملاريا.

تمت التوصية بالمعايير المذكورة أعلاه بناء على اعتبار أنه من غير المتوقع أن يكون بقاء أكثر من 2% على قيد الحياة في التركيز التشخيصي ناجماً عن الفرصة وحدها، بشرط تلبية كل شروط الاختبار الملخصة لاحقاً.

يمكن اعتبار أن تسجيل معدل للموت أقل من 98% في اختبارات أجريت تحت شروط مثالية من درجة الحرارة والرطوبة مع حجم عينة مؤلف من 100 بعوضة على الأقل، مكررة (منسوخة) مرتين أو ثلاث مرات باستخدام أوراق مشربة حديثة (أي قبل تاريخ انتهاء الصلاحية على الصندوق) لم تستخدم لأكثر من 6 مرات، ونجاحها مثبتة على بعوض حساس، يمكن اعتباره اشتهاً قوياً بالمقاومة، ويجب استقصاؤه أكثر.

يجب أخذ الحيطة عند تفسير نتائج المقاييس البيولوجية المنفردة، وخاصة عند استخدام الإناث الممسوكة من البر. قد تؤثر تقنيات الاعتيان على النتائج، فعلى سبيل المثال: قد تنحاز عمليات الالتقاط الداخلي نحو الحشرات التي قد تكون تعرضت مسبقاً لمبيدات الحشرات ونجت (أي تتضمن نماذج من المحتمل أكثر أن تكون مقاومة). قد تؤدي عينات الأنواع المختلفة إلى نتائج مضللة أو غير حاسمة، حيث من المرجح جداً أن يختلف تواتر جين المقاومة بين الأنواع، وحتى الأشكال الجزيئية بين النوع نفسه. ولهذا السبب، من المهم التعرف على الحشرات المختبرة، واختبار كل نوع بشكل منفصل بحثاً عن بيئة على المقاومة.

الإطار 1.4

إدارة مقاومة مبيدات الحشرات : مبادرات إقليمية لتشارك المعطيات

تغطي شبكات دعم الموارد لمراقبة مقاومة مبيدات الحشرات في نواقل الملاريا في أفريقيا ، والتي ابتدأت بالمبادرة المتعددة الجوانب لشبكة الملاريا حول مقاومة مبيدات الحشرات في جنوب أفريقيا، تغطي الآن كامل القارة على شكل الشبكة الأفريقية حول مقاومة الناقل ANVR. تؤسس شبكات مشابهة لأقاليم أخرى ، وسوف تربط بعد ذلك بقاعدة معطيات عالمية حسب ما لخص في الخطة العالمية لإدارة مقاومة مبيدات الحشرات في نواقل الملاريا (6) (GPIRM). أسست شبكة مشابهة لإقليم ميكونغ Mekong (إقليمي جنوب شرق آسيا وغرب المحيط الهادي في منظمة الصحة العالمية) لتنسيق وتقوية الكفاءات لمراقبة مقاومة مبيدات الحشرات لكل من نواقل الملاريا وحمى الدنك dengue. ركزت أقاليم أخرى من أقاليم منظمة الصحة العالمية (مثل شرق المتوسط) على تقوية القدرات الوطنية لمراقبة مقاومة مبيدات الحشرات، ويتم تشارك النتائج والخبرات بانتظام من خلال الاجتماعات السنوية الإقليمية لمدرء برامج المكافحة.

3.4 تبليغ نتائج اختبار الحساسية

بالتوازي مع توصيات منظمة الصحة العالمية الموضوعية في الخطة العالمية لإدارة مقاومة مبيدات الحشرات في نواقل الملاريا، تشجع البرامج الوطنية لمكافحة الملاريا على تنسيق جمع معطيات مقاومة مبيدات الحشرات وتحليلها والتبليغ عنها والمشاركة فيها في الوقت المناسب. فإن لم يكن أحدها موجوداً مسبقاً فيجب تأسيس قاعدة معطيات وطنية على الكفاءة ذات الصلة لهذه الغاية (6). مثالياً، يجب تسليم نتائج اختبار الحساسية إلى الهيئة التنسيقية المركزية خلال ثلاثة أشهر من جمعها.

يجب تسليم نتائج اختبار المقايسة البيولوجية إلى منظمة الصحة العالمية أيضاً، لتضمينها في قاعدة معطيات عالمية متراكمة حول مقاومة مبيدات الحشرات، والتي هي قيد التطوير حالياً من قبل منظمة الصحة العالمية. سوف تعتمد قاعدة المعطيات هذه على قواعد المعطيات والشبكات الإقليمية وترتبط بها (انظر الإطار 1.4).

5. استقصاءات مستقبلية : التعرف على آليات المقاومة

إذا وجد عدد يعتد به من البعوض الناجي على التراكيز التشخيصية (كما ذكر سابقاً) (القسم 4) (أكثر من 2%) فسيكون من الضروري إجراء اختبارات أكثر لتحديد الآليات الجينية الأساسية المسؤولة عن المقاومة المشاهدة. يجب أن تتضمن هذه الاستقصاءات: التعرف على الناجين (الباقين على قيد الحياة) و20% من الحشرات الميتة على الأقل بهدف التعرف على أي أنواع البعوض التي توجد فيها علامات المقاومة. سوف لن تساعد هذه المعلومات في تقدير احتمال المقاومة المتصالبة بين أصناف مبيدات الحشرات فقط، وإنما سوف توفر معلومات قيمة أيضاً حول احتمال انتشار المقاومة في جماهير الناقل. على سبيل المثال: إذا وجدت بيئة على وجود طفرات لمقاومة الصرع (والتي تسمح بالمقاومة ضد البيريثرويد) في جمهرة ناقل معينة فمن المرجح أن تكون نفس الجمهرة مقاومة لمبيد د.د.ت أيضاً.

ورغم أن النموذج المشاهد من المقاومة المتصالبة بين مبيدات الحشرات المختلفة قد يوحي بآلية مشتركة (على سبيل المثال: بيئة من المقاومة لكل من د.د.ت والبيريثرويد توحى بوجود آليات مقاومة الموقع المستهدف) فيجب إثبات طبيعة آلية المقاومة دائماً باختبارات مناسبة. في أي جمهرة معينة من البعوض: يمكن وجود كل من الآلية الاستقلابية وآلية الموقع المستهدف، ولذلك يجب استقصاء كلا الاحتمالين.

ومع تطور استيعاب آليات مقاومة مبيدات الحشرات في البعوض والنواقل الحشرية الأخرى فقد حدث تقدم كبير في تطوير اختبارات تشخيصية جديدة لاكتشاف آليات المقاومة.

يتوفر حالياً عدد من تقنيات مقايسة الإنزيم الكيمائية البيولوجية، والتي تكتنف وجود آليات مقاومة استقلابية. كما يتوفر عدد من المقايسات البيولوجية، والتي يمكن أن تستخدم لاختبار طفرات الموقع المستهدف (مقاومة الصرع بالنسبة للبيريثرويد و د.د.ت، و Ace1 بالنسبة لمركبات الفسفات العضوية والكاربامات). ورغم هذا التقدم، يبقى هذا النمط من العمل مكثفاً للموارد نسبياً، حيث أنه يتطلب معدات متخصصة وخبرة. يوصى في المواقع التي تكون فيها الموارد والمرافق محدودة بأن يساعد بتحليل عينات ممثلة تطلب من مؤسسات خارجية.

إن التوصيف المفصل للتقنيات والطرق الموصى بها للتحليل الكيمائي البيولوجي الجزئي خارج نطاق هذه الدلائل الإرشادية. وللحصول على هذا النوع من المعلومات ينصح المستخدمون باستشارة: طرق في بحوث الأنوفيلة المتوفر عبر الرابط التالي:

<http://www.mr4.org/Publications/MethodsInAnophelesResearch/tabid/336/Default.aspx>

1.5 مقايسات الإنزيم الكيمائية البيولوجية

يجب أن يكون البعوض الذي سيخضع لمقايسات الإنزيم الكيمائية البيولوجية بحثاً عن المقاومة الاستقلابية نشيطاً. وبشكل بديل: يمكن خزن النماذج بدرجة - 70°م في النتروجين السائل للاستعمال لاحقاً.

يجب ألا تكون النماذج التي ستخضع للتحليل الكيمائي البيولوجي قد تعرضت لمبيد حشرات؛ وهذا سبب آخر لتفضيل استخدام نسل الجيل الأول من الإناث الممسوكة من البر بدلاً من الإناث الممسوكة من البر مباشرة لإجراء اختبار الحساسية. أكثر من ذلك: يجب ألا تكون الإناث البالغة الممسوكة من البر قد أجرى عليها مقايسات كيمائية بيولوجية، لأن وجبات الدم المبتلع تحتوي بروتينات تتفاعل مع الركائز المستخدمة في المقايسات مسببة انحرافات يعتد بها significant في كمية الإنزيم المكتشف لكل بعوضة؛ وهذا صحيح بشكل خاص في مقايسة أحادي الأوكسيجيناز.

عند الاعتماد على تجميعات اليرقات، يمكن الاحتفاظ بعينة جزئية (العدد = 100) من البعوض البالغ الناشء من اليرقات وتخزينها للتحليل الكيمائي البيولوجي حسب ما اقترح. سيكون من الضروري تربية دفعات batches البيض بشكل منفرد إن كانت تجميعات الإناث البرية صغيرة جداً. على كل: سوف تحتاج كل دفعة بيض لأن تختبر على مبيد الحشرات المناسب

أيضاً؛ وبذلك يعرف شكل المقاومة عند النسل. وهذا عمل ضخم، والأفضل أن يتم في مختبرات لها معدات ومهارات متخصصة. يجب القيام بهذه الاختبارات من أجل كل بؤرة جديدة من المقاومة.

2.5 الاختبارات الجزيئية (البيولوجية)

يمكن إنجاز الاختبارات الجزيئية molecular (البيولوجية biological) للمقاومة (آليات مقاومة الموقع المستهدف) بعد المقايسة البيولوجية. على كل، من المهم تخزين البعوض بشكل مناسب من أجل تنفيذ التقنيات الجزيئية بنجاح. يمكن تخزين البعوض، حالما يُختبر على مبيد الحشرات، في أنابيب بلاستيكية تحتوي هلام السيليكون (مع مؤشر أزرق ليبيّن متى يكون الهلام جافاً/رطباً) أو الإيثانول، أو محاليل مصممة بشكل نوعي لهذه الغاية (مثلاً RNA-LATER®)، وتحفظ في درجة - 20 °م. يجب وضع البعوض بشكل منفرد ضمن أنابيب إيبندروف سعة 0.5 مل. يجب توسيم الأنابيب حسب مبيد الحشرات المختبر، وفيما إذا كانت البعوضة ميتة أو حية بعد 24 ساعة.

وكقاعدة أولية مستقاة من الخبرة، يجب استقصاء كل البعوض الناجي وعينة ممثلة من البعوض الميت في التركيز التشخيصي. ورغم أنه يجب خزن البعوض بشكل منفصل لتجنب التلوث المتصالب للدنا في الأماكن التي يوجد فيها نوع واحد فقط، ويختبر من أجل آليات المقاومة فقط، فإنه يمكن وضع العديد من البعوض في الأنبوب نفسه. من المهم معالجة كل من البعوض الحي والميت للحصول على عينة ممثلة للجمهرة. بعض آليات المقاومة، مثل طفرات مقاومة الصرع، تكون متنحية؛ ولذلك يوصى باختيار عدد كبير من البعوض عند فحص جمهرة بحثاً عن طفرات الموقع المستهدف، حتى ولو بدت الجمهرة حساسة على الاختبارات التشخيصية.

3.5 مقايسات المؤازر

يمكن التبصر بآليات المقاومة المحتملة بمقايسات المؤازر synergist. وهي تجارب من نمط المقايسة البيولوجية المصممة لتقدير المدى الذي تساهم فيه الإنزيمات المزيللة للسمية في إحداث أمطاط جينية مقاومة؛ وترتكز على استخدام مؤازرين - وهي مركبات ليست مبيدة للحشرات يمكن أن توهن تعبير مقاومة مبيدات الحشرات بتوفير ركائز بديلة لأصناف مخصصة من الإنزيم المزيل للسمية.

تستخدم هذه المقايسات كأدوات بحثية حالياً، ويتطلب تفسير النتائج خبرة معتبرة. سوف يتم تغطية الدلائل الإرشادية حول استخدام المؤازرين في طبعة وشبكة صادرة عن منظمة الصحة العالمية.

6. اختبارات الحساسية المكتملة: المقايسة البيولوجية القارورية بحسب مراكز مكافحة الأمراض والوقاية منها

توفر المقايسة البيولوجية القارورية CDC bottle bioassay بحسب مراكز مكافحة الأمراض والوقاية منها. طريقة مكتملة لاكتشاف مقاومة مبيدات الحشرات في جماهر ناقل الملاريا؛ وتستخدم على نطاق واسع في المراقبة الروتينية اليومية لجماهر البعوض. وعلى عكس المقايسة البيولوجية بحسب منظمة الصحة العالمية، والتي تقيس معدلات الموت في البعوض المعرض لتركيز عال من مبيد الحشرات لفترة ثابتة من الزمن، فإن المقايسة البيولوجية القارورية بحسب مراكز مكافحة الأمراض والوقاية منها تقيس المدة الزمنية التي تستغرقها لقتل عينة من البعوض البالغ المعرض لتركيز معروف من مبيد الحشرات.

يمكن إنجاز اختبار القارورية بحسب مراكز مكافحة الأمراض والوقاية منها على الإناث البالغة المجمعة من الحقل أو تلك التي تربى في محشرة من تجمعات اليرقات. ومثل المقايسة البيولوجية بحسب منظمة الصحة العالمية، يمكن تعبير الاختبار بتحديد جرعات تشخيصية وأزمان تعرض لمبيدات حشرات منفردة وكل نوع ناقل رئيسي باستخدام جماهر يعرف أنها حساسة. وحالما يتم تحديد ذلك، يمكن القيام باختبار لاحق مع الوقت والجرعة التشخيصية فقط. يكتنف الاختبار تسجيل عدد البعوض الناجي بعد فترة التعرض التشخيصية (أي الوقت الذي قتل فعلاً بشكل يعول عليه 100% من جمهرة الاختبار الأصلية).

نشر وصف تفصيلي للمقايسة البيولوجية القارورية بحسب مراكز مكافحة الأمراض والوقاية منها، متضمناً المنهجيات من مراكز مكافحة الأمراض والوقاية منها في أتلانتا في الولايات المتحدة الأمريكية في أكتوبر 2010 باسم: الدليل الإرشادي لتقييم مقاومة مبيدات الحشرات في النواقل المفصليّة الأرجل arthropod باستخدام المقايسة البيولوجية القارورية بحسب مراكز مكافحة الأمراض والوقاية منها (متوفر باللغة الإنكليزية والإسبانية).

يتوفر إصدار مباشر من الدلائل الإرشادية مكتملة برسوم متحركة على:

<http://www.cdc.gov/ncidod/wbt/resistance/assay/bottle/index.htm>

يتوفر إصدار مع صور على:

<http://www.mr4.org/AnophelesProgram/TrainingMethods.aspx>

يجب ملاحظة الإرشادات التالية إذا أريد استخدام المقايسة البيولوجية القارورية بحسب مراكز مكافحة الأمراض والوقاية منها بهدف التردد الروتيني للحساسية لمبيدات الحشرات:

- يجب الالتزام بالإجراءات المفصلة في الدلائل الإرشادية لمراكز مكافحة الأمراض والوقاية منها بدقة، وخاصة تلك المتعلقة باستخدام مذيّات مبيدات الحشرات الموصى بها (الإيثانول/الأسيتون) وبروتوكولات المعالجة بالقارورة.
- يجب شراء مبيدات الحشرات اللازمة للاختبار من مراكز مكافحة الأمراض والوقاية منها،
- يجب الالتزام بمدد التعرض لمبيد الحشرات وتراكيزه حسب ما هو مذكور في الجدول 1.6.

تقدم المقايسة البيولوجية القارورية بحسب مراكز مكافحة الأمراض والوقاية منها عدداً من المزايا على اختبارات أنبوب الحساسية بحسب منظمة الصحة العالمية، ويمكن تلخيصها بالتالي:

- يتم تجنب مجموعة أدوات الاختبار المعدة مسبقاً والأوراق المشربة بمبيدات الحشرات (والتي يجب أن يكون مصدرها المرکز المتعاون مع منظمة الصحة العالمية في ماليزيا)، مما يسمح بمرونة أكثر في نمط وتركيز مبيد الحشرات الذي يمكن تقييمه،
- الإجراء بسيط نسبياً وسريع في التنفيذ (على سبيل المثال: لا يحتاج فترة مسك لمدة 24 ساعة)،
- يمكن إنجاز الإجراء بمؤازرات مختلفة أيضاً، مما يوفر بديلاً سريعاً ورخيصاً لطرق جزيئية وكيميائية بيولوجية أكثر تعقيداً للاختبار وجود آليات مقاومة استقلابية،
- قد تكتشف المقاومة أكبر بسبب استخدام جرعات تمييز أقل،

الجدول 6.1

تراكيز مبيد الحشرات والوقت التشخيصي (بالدقائق) للبعوض

الوقت التشخيصي (دقائق)	تركيز مبيد الحشرات لكل نوع		مبيد الحشرات
	الزاعجة Aedes	الأنوفيلة Anopheles	
30	12.5	12.5	بنديوكارب
30	10	12.5	سيفلوثرين
30	10	12.5	سيبيرميثرين
30	10	12.5	دلتا ميثرين
30	10	12.5	لامبدا سيبهاالوثرين
30	15	21.5	بيرميثرين
45	75	100	ددت
30	50	50	ملاثيون
30	50	50	فينيتروثيون
30	--	20	بريميفوس-ميثيل

المصدر : المرجع (22)

تتضمن المساوي:

■ صعوبات تتوافق بالاحتفاظ بمستوى عال من ضمان الجودة ومراقبتها (تحضير القوارير الزجاجية حساس بشكل خاص لمشاكل ضمان الجودة، لأنه من المرجح أن تختلف المختبرات في الطريقة التي تسلكها لتحضير المعدات قبل الاختبار وبعده)،

■ الحاجة لنقل القوارير الزجاجية في الميدان، وخاصة على فترات واسعة عندما لا يكون الوصول إلى المختبرات ممكناً،

■ ضرورة فصل البعوض الميت والحي بعد فترة التعرض المطلوبة من أجل خزنه للتعرف لاحقاً على النوع واستقصاء الآليات،

لاحظ أنه، ورغم أن الطريقتين تبلغ عن معدلات الموت كنسبة مئوية، فإن النتائج التي يتم الحصول عليها من المقايسة البيولوجية القارورية بحسب مراكز مكافحة الأمراض والوقاية منها لا تقارن مباشرة مع تلك الواردة من اختبار الأنوب للحساسية بحسب منظمة الصحة العالمية. على كل: بينت كلتا الطريقتين أنهما تتعرفان على مقاومة مبيدات الحشرات عند وجودها على نحو يعول عليه (23).

7. توصيات إضافية

- هناك عدد من التوصيات العامة تتعلق بمراقبة مقاومة مبيدات الحشرات تستحق الذكر وهي:
- برامج مراقبة المقاومة الفعالة تعتمد على عاملين مدربين تدريباً كافياً؛ وما زال هذا تحدياً رئيسياً في معظم البلدان، ويتم التعامل معه في عدد من المؤسسات والشركاء المنفذين. ويجب إعادة تقييم احتياجات التدريب على مستوى بلد ما والتعامل معه.
 - طورت اختبارات جزيئية بسيطة سريعة مرتكزة على تفاعل البوليميراز السلسلي في السنوات الأخيرة، وتستخدم حالياً في اكتشاف وجود طفرات مقاومة الصرع. استخدمت مراقبة تواتر طفرات مقاومة الصرع في الأنوفيلة الغامبية في الأجزاء الغربية من أفريقيا باستخدام هذه الطرق في بعض الحالات كعامل لتقدير وجود مقاومة للد.ت أو البيريثرويد. وهذه ليست ممارسة موصى بها عامة؛ ويجب أن تنفذ اختبارات الحساسية بحسب منظمة الصحة العالمية (أو المقاييس البيولوجية القارورية بحسب مراكز مكافحة الأمراض والوقاية منها) دائماً، بالإضافة إلى المقاييس الجزيئية. إن معرفة الآليات المكتنفة في المقاومة مفيد دائماً، لأن المقاومة المتصالبة بين أصناف مبيدات الحشرات يمكن أن تُمنح، ثم تستخدم المقاييس البيولوجية بعد ذلك لاختبار الأهماط الجينية المقاومة. هذا النمط من المعلومات مفيد جداً للتخطيط لاستراتيجيات إدارة المقاومة.
 - يمكن ربط معطيات المقاومة بمعطيات العدوى بالطفيليات بالتعامل مع نفس البعوض البري البالغ المستخدم في المقاييس البيولوجية لاكتشاف الحيوانات البوغية عندما تتوفر التسهيلات المختبرية. ويجب إثبات العينات الإيجابية المكتشفة باختبار مقاييس الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم ELISA باختبار ثانٍ بمقاييس الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم والذي تم تسخينه (24) أو بتفاعل البوليميراز السلسلي.
 - من أجل مبيدات الحشرات الجديدة التي لا تعمل على نحو رئيس من خلال الآثار المميته، وإنما من خلال تشويش فيزيولوجيا الحشرة، مثل سلوك الاقليات على الدم أو الخصوبة /fertility الخصوبية fecundity، يوصى بتطوير دلائل إرشادية أخرى لاختبار هذه المنتجات.

1. World Health Organization. *World malaria report 2012*. Geneva, 2012.
2. WHO. *Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance*, 6th ed. Geneva, World Health Organization, 2006.
3. WHOPES. *Global insecticide use for vector-borne disease control: a 10-year assessment (2000–2009)*, 5th ed. Geneva, World Health Organization, 2011.
4. WHO. *World malaria report 2011*. Geneva, World Health Organization, 2011.
5. 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.
6. WHO. *Global plan on insecticide resistance management in malaria vectors (GPIRM)*. Geneva, World Health Organization, 2012.
7. WHO. *Supplies for monitoring insecticide resistance in disease vectors. Procedures and conditions*. Geneva, World Health Organization, 2001.
8. WHO. *Criteria and meaning of tests for determining the susceptibility or resistance in insects to insecticides*. Geneva, World Health Organization, 1981.
9. WHO. *Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides – diagnostic test*. Geneva, World Health Organization, 1981.
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.
11. WHO. *Insecticide resistance and vector control. Tenth report of the Expert Committee on Insecticides* [meeting held in Geneva from 14 to 19 September 1959]. Geneva, World Health Organization, 1960 (WHO Technical Report Series, No. 191).
12. WHO. *Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides*. Geneva, World Health Organization, 1981.
13. WHO. *Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides*. Geneva, World Health Organization, 2005.
14. 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 (WHO Technical Report Series, No. 585).
15. WHO. *Vector resistance to pesticides. Fifteenth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control*. Geneva, World Health Organization, 1992 (WHO Technical Report Series, No. 181).
16. Raghavendra K et al. Chlorfenapyr: a new insecticide with novel mode of action can control pyrethroid resistant malaria vectors. *Malaria Journal*, 2011, 10(1):16.
17. N'Guessan R et al. Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase, *Medical and Veterinary Entomology*, 2003, 17(1):19–25.

18. Ahoua Alou LP et al. Distribution of ace-1R and resistance to carbamates and organophosphates in *Anopheles gambiae* s.s. populations from Côte d'Ivoire. *Malaria Journal*, 2010, 9:167.
19. 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 Management Science*, 2001, 57(1):41–45.
20. Brooke BD, Hunt RH, Coetzee M. Resistance to dieldrin + fipronil assort with chromosome inversion 2La in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Medical and Veterinary Entomology*, 2000, 14(2):190–194.
21. Lines JD, Nassor NS. DDT resistance in *Anopheles gambiae* declines with mosquito age. *Medical and Veterinary Entomology*, 1991, 5(3):261–265.
22. CDC. *Guideline for evaluating insecticide resistance in arthropod vectors using the CDC bottle bioassay*. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 2010.
23. Perea EZ et al. Adaptation and evaluation of the bottle assay for monitoring insecticide resistance in disease vector mosquitoes in the Peruvian Amazon. *Malaria Journal*, 2009, 8:208
24. Durnez L et al. False positive circumsporozoite protein ELISA: a challenge for the estimation of the entomological inoculation rate of malaria and for vector incrimination. *Malaria Journal*, 2011, 10:195.

الملحق 1 : استمارة تسجيل معطيات اختبار الحساسية في الميدان

رمز القرية □□□ رقم الاختبار □□□□ التاريخ (اليوم / الشهر / السنة): □□/□□/□□
اسم المحقق (الباحث) رمز المحقق □□□

معلومات عن المنطقة

البلد : المقاطعة :
المنطقة الصحية : الناحية : القرية :
نظام التوزيع الجغرافي س: □□□. □□□ ع: □□□. □□□

معلومات عن العينة

النوع المختبر: مكافحة النوع:
الجنس: العمر(بالأيام): (فقط إن كان معروفاً: المستعمرة، الجيل الأول)

طريقة التجميع

- الصيد البشري داخليا الاستراحة ليلاً داخلياً الاستراحة نهاراً داخلياً
جمع من الماشية الاستراحة ليلاً في الهواء الطلق الصيد البشري في الهواء الطلق
طرق أخرى: حدد تجميعات اليرقات نسل الجيل الأول
المستعمرة اسم ذرية المستعمرة:

المرحلة الفيزيولوجية

- اقتيات على غير الدم اقتيات على الدم حامل جزئياً حامل

معلومات عن مبيد الحشرات المختبر

مبيد الحشرات المختبر: تاريخ انتهاء الصلاحية: □□/□□/□□
الأوراق المشربة محضرة من قبل: تاريخ فتح أول صندوق: □□/□□/□□
التركيز: عدد مرات استخدام هذه الورقة: □□
شروط التخزين: درجة حرارة الغرفة مبردة

شروط الاختبار

البداء . □□ درجة الحرارة م°
انتهاء الاختبار . □□ الرطوبة النسبية %

الملحق 2 :استمارة تسجيل نتائج اختبار الحساسية في الميدان

الشاهد 2	الشاهد 1	النسخة 4	النسخة 3	النسخة 2	النسخة 1	رقم التعرض

عدد البعوض المصروع بعد التعرض حسب الدقائق

الشاهد 2		الشاهد 1		النسخة 3		النسخة 2		النسخة 1		
العدد	الوقت									
										البدء
										10'
										15'
										20'
										30'
										40'
										50'
										60'

عدد البعوض الميت / الحي في نهاية فترة المسك (24 ساعة)

الشاهد 2	الشاهد 1	النسخة 4	النسخة 3	النسخة 2	النسخة 1	عدد الميت
						عدد الحي

تكمل من قبل المشرف في نهاية الاختبار

رمز المشرف □□□

التعليق.....
.....

أؤكد أن الاستمارة مكتملة.

التاريخ: □□□□ / □□ / □□

الاسم.....

التوقيع.....

تكمل من قبل موظفي إدخال المعطيات خلال إدخال المعطيات

موظف إدخال المعطيات 2

موظف إدخال المعطيات 1

التاريخ □□□□ / □□ / □□

التاريخ □□□□ / □□ / □□

التوقيع.....



للمزيد من المعلومات

المكتب الإقليمي لمنظمة الصحة العالمية لشرق المتوسط، ص. ب. 7608، مدينة نصر،

القاهرة 11371، مصر

(هاتف رقم: +20226702535، فاكس رقم: +20226702492؛

وعنوان البريد الإلكتروني: emrgoksp@who.int).

