

# Niveles de resistencia a dos insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del Perú

Levels of resistance to two insecticides in populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Perú

JULIO CÉSAR CHÁVEZ G.<sup>1</sup>, JUDITH ROLDÁN R.<sup>2</sup>, FRANKLIN VARGAS V.<sup>3</sup>

Revista Colombiana de Entomología 31 (1): 75-78 (2005)

**Resumen.** El propósito del presente trabajo consistió en determinar los niveles de resistencia a temefos y deltametrina en dos poblaciones naturales de *Aedes aegypti* del Perú. Los bioensayos en larvas y adultos se realizaron siguiendo la metodología de la Organización Mundial de la Salud. La visualización de bandas de B-esterasas se hizo por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en larvas de cuarto estadio. Las poblaciones naturales de Sullana (Piura) y El Porvenir (La Libertad) presentaron factores de resistencia para temefos de 1,67 X y 1,45 X, respectivamente, indicando susceptibilidad en ambas poblaciones; para deltametrina la población de Sullana presentó resistencia con un KDT<sub>50</sub> de 106 min y 68% de mortalidad a las 24 h, en la población de El Porvenir se observó susceptibilidad con un KDT<sub>50</sub> de 36,9 min y 99% de mortalidad. Se identificó la esterasa B<sub>2</sub> con un Rf de 0,23 sólo en la población El Porvenir. El insecticida temefos puede seguir siendo utilizado en los programas de control del vector *Aedes aegypti* ya que la especie aún es susceptible a este organofosforado; caso contrario sucede con deltametrina donde se debe evaluar su efecto en poblaciones naturales ya que algunas deben estar presentando resistencia, como en el caso de la población de Sullana.

**Palabras clave:** Bioensayos. KDT<sub>50</sub>. B-esterasa.

**Summary.** The purpose of this study was to determine resistance levels to temephos and deltamethrin in two natural populations of *Aedes aegypti* from Peru. Bioassays in larvae and adults were carried out following the methodology of the World Health Organization. The visualization of B-esterase bands was made by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in fourth instar larvae. Natural populations from Sullana (Piura) and El Porvenir (La Libertad) presented resistance ratios to temephos of 1.67 X and 1.45 X, respectively, indicating susceptibility in both populations; for deltamethrin the Sullana population presented resistance with a KDT<sub>50</sub> of 106 min and 68% mortality at 24 h; in the El Porvenir population susceptibility was observed, with a KDT<sub>50</sub> of 36.9 min and 99% mortality. Esterase B<sub>2</sub> was identified with a Rf of 0.23 only in El Porvenir population. The insecticide temephos can continue being used in control programs of the *Aedes aegypti* vector because the species is still susceptible to this organophosphate; on the contrary with deltamethrin, where its effects should be evaluated in natural populations since some of them should be presenting resistance, as in the case of the Sullana population.

**Key words:** Bioassays. KDT<sub>50</sub>. B-esterase.

## Introducción

*Aedes aegypti* (Linnaeus) es el vector del virus del dengue en las Américas, se distribuye usualmente entre las latitudes de 35° LS y 35° LN; pero ha sido encontrado hasta una latitud de 45° LN (Bisset 2002). En el Perú, fue detectado por primera vez en 1852, se cree que éste ingresó por el norte, desde Guayaquil-Ecuador, para luego establecerse progresivamente a lo largo de la costa norte y central peruana, extendiendo su distribución hasta Tacna (Sevilla *et al.* 2001).

En el Perú, frente a la presencia de *Ae. aegypti*, el Programa de Control Vectorial del Ministerio de Salud ha hecho uso del larvicida organofosforado temefos y nebulización espacial de piretroides como

el adulticida deltametrina (CICE 2000; Vargas *et al.* 2003).

Estudios sobre el uso indiscriminado de insecticidas indican que en 1947 se registró el primer caso de resistencia a DDT en *Ae. taeniorhynchus* (Wiedemann) y *Ae. sollicitans* (Walker) (Brown 1986); en poblaciones de *A. aegypti* de Venezuela y Cuba se ha indicado la resistencia a temefos pirimifos metil, clorpirifos y cipermetrina (Bisset *et al.* 2001). Asimismo, la resistencia a malatión, diazinón y DDT ha sido registrada en Brasil y en Puerto Rico (Campos y Andrade 2001).

Se ha demostrado que en *Ae. aegypti*, la capacidad de resistir al malatión está asociada a la detoxificación mediada por enzimas de actividad específica: carboxiles-

terasas y el incremento de los niveles de resistencia a temefos está presuntamente asociado con este mecanismo, sólo que las enzimas detoxificadoras son fosfatasa (Bisset *et al.* 2001). Existen otros mecanismos de resistencia en *Ae. aegypti*, como son el gen *kdr*, basado en la insensibilidad en el sitio de acción responsable de la resistencia cruzada a DDT y piretroides, la enzima glutatión-s-transferasa, responsable de la resistencia a organofosforados y DDT, finalmente la familia de oxidasas del citocromo P-450 que interviene en la resistencia a organofosforados, piretroides y DDT (Bisset *et al.* 2001; Bisset 2002).

Teniendo en cuenta que *Ae. aegypti* es una especie que se ha establecido paulatinamente en el Perú, ocasionando numerosos casos de dengue en el año 2002, es

1 Autor para correspondencia: Bioanalista, M. Sc. Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud (CICS), Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, Apartado Postal 4774, Puerto La Cruz 6023. Anzoátegui, Venezuela. Teléfono: (0281) 2770107, Fax: (0281) 2770107. E-mail: viveses95@hotmail.com

2 Biólogos, M. Sc. Centro de Investigaciones "José Witremundo Torrealba". Universidad de Los Andes, NURR-Trujillo, Venezuela Apdo. 214. E-mail: longipalpis@cantv.net

que el presente trabajo tuvo como objetivo determinar los niveles de resistencia al larvicida temefos y adulticida deltametrina en dos poblaciones naturales de *Aedes aegypti* del norte peruano, colectadas durante el año 2002.

## Materiales y Métodos

### Material Biológico

Para el trabajo se utilizaron 2 poblaciones naturales de *Aedes aegypti*, una del distrito de Sullana (Piura) y la otra del distrito El Porvenir (La Libertad) y una cepa de referencia Rockefeller, suministrada por el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK) La Habana-Cuba. Las colonias se establecieron y mantuvieron en el insectario del Instituto de Investigación en Microbiología y Parasitología Tropical (INIMYPAT) con temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  y humedad relativa de 65%.

### Insecticidas

El insecticida temefos al 93,3% de pureza, fue suministrado por el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" La Habana-Cuba. Los papeles impregnados con deltametrina al 0,025%, fueron suministrados por el Centro de Investigación de Paludismo, Tapachula, Chiapas-México.

### Bioensayo de resistencia y/o susceptibilidad a insecticidas en larvas

Los bioensayos se realizaron siguiendo la metodología de la Organización Mundial de la Salud (WHO 1981). Se utilizaron larvas del tercer o cuarto estadio temprano de cada población incluyendo la cepa de referencia Rockefeller. Se emplearon 5 réplicas de cada concentración del insecticida (20 larvas por réplica) produciéndose mortalidades entre 2 y 98%. Todas las soluciones se ajustaron a un volumen final de 1 ml con acetona. Esta concentración de acetona no causó mortalidad en los controles. La lectura de las mortalidades se realizó a las 24 h y los resultados se procesaron mediante el programa probit-log (Raymond 1985) para obtener la  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$ .

### Bioensayos de resistencia y/o susceptibilidad a insecticidas en adultos

Los bioensayos se hicieron siguiendo la metodología de la Organización Mundial de la Salud (WHO 1981). Grupos de 18-25 mosquitos adultos hembras se expusieron a papeles impregnados con deltametrina 0,025% en tubos patrones de prueba de la WHO (12 x 4 cm) a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  y 70% de humedad relativa. El tiempo de exposición fue de 1 h, el número de mosquitos muertos al contacto con el papel impregnado con insecticida se registró a los 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 min, después se transfirieron a un tubo vacío limpio, provisto con un algodón humedecido con agua azucarada, y se mantuvieron hasta las 24 h para realizar la lectura de mortalidad, donde 100 - 98% de mortalidad indica susceptibilidad, 97-80% de mortalidad indica que se debe realizar confirmación de resistencia y menos de 80% de mortalidad señala resistencia (WHO 1998). Se realizaron 5 réplicas para cada población. Los controles se expusieron a papeles impregnados con aceite de oliva, los resultados se procesaron mediante el programa probit-log (Raymond 1985) para obtener  $KDT_{50}$  y  $KDT_{90}$ .

### Determinación del factor de resistencia

Se determinó mediante la fórmula (Bisset et al. 1996):

$$FR = CL_{50} \text{ cepa a evaluar} / CL_{50} \text{ cepa susceptible de referencia}$$

FR < 5 = Susceptible

FR > 5 = Resistente

### Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida (9%). Se homogeneizó cada larva con 200 ul de buffer fosfato 0,01M, pH 7,5. En tubos Eppendor (1,5 ml) se adicionaron 15 ul del homogeneizado más 10 ul del indicador azul de bromofenol. Se aplicaron 20 ul de esta mezcla en el gel y se

corrió a 150V, durante 45 min. Para la tinción de las bandas de esterases, se sumergió el gel en 50 ml de buffer fosfato (0,1M, pH 7,5), que contenía 4 ml cada uno del sustrato inespecífico  $\beta$ -naftilacetato. Después se añadieron 2 ml de colorante Fast Garnet, disuelto previamente en buffer fosfato 0,1M, pH 7,5. Para observar el nivel de migración de las bandas de esterases en el gel, se determinó la movilidad relativa de las mismas, mediante la fórmula: M. R. = Distancia recorrida de la enzima / Distancia total del gel (Murray et al. 1997).

## Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos en los bioensayos en larvas (Tabla 1) indican valores de factores de resistencia de 1,67 X y 1,45 X para las poblaciones de Sullana y El Porvenir frente a temefos respectivamente, el resultado encontrado en la población El Porvenir es similar al hallado para esta zona 1,93 X (Vargas et al. 2003). Se registraron altos niveles de resistencia a temefos en poblaciones de Venezuela y Cuba con un  $FR_{50}$  de 11,1 X y  $FR_{50}$  de 5,9 X, respectivamente (Bisset et al. 2001), una población de Brasil presentó un  $FR_{50}$  de 6,3 X (Campos y Andrade 2001); poblaciones de Venezuela manifestaron susceptibilidad con  $FR_{50}$  de 3,9 X y 2,58 X (Bisset et al. 2001), en Brasil una población manifestó un  $FR_{50}$  de 2,7 X (Campos y Andrade 2001). La explicación de estos valores altos, 11,1 X 6,3 X y 5,9 X, es que a partir de 1977-1980 apareció la epidemia del dengue 1 en el Caribe produciéndose luego la fiebre del dengue hemorrágico con su primera gran epidemia en Cuba en 1981 (Schneider y Droll 2001), por lo que se realizaron campañas de erradicación del vector donde se emplearon insecticidas, ocasionando como consecuencia los primeros casos de resistencia. En el Perú, dengue 1 aparece recién en Loreto en 1990 (Schneider y Droll 2001); haciéndose uso de temefos para el control de *Ae. aegypti* en los años 1999 y 2000 cuando se tiene un gran número de casos de dengue en el norte peruano (CICE 2000; Vargas et al.

Tabla 1. Concentraciones letales 50 y 95%, valor de la pendiente de regresión y factor de resistencia a temefos para larvas de *Aedes aegypti* de las poblaciones colectadas en el año 2002 en Sullana (Piura) y El Porvenir (La Libertad) comparado con la cepa de referencia Rockefeller

Población	$CL_{50}^a$	$CL_{95}^a$	$b^b$	$FR_{50}^c$
Sullana	0,01712 (0,01185 - 0,02473)	0,04361 (0,02396 - 0,08068)	4,0513 ( $\pm$ 1,1341)	1,67
El Porvenir	0,01554 (0,01415 - 0,01710)	0,03742 (0,03236 - 0,04785)	4,3113 ( $\pm$ 0,3121)	1,45
Rockefeller*	0,01055 (0,00976 - 0,01156)	0,02166 (0,01805 - 0,02932)	5,2672 ( $\pm$ 0,7052)	-

<sup>a</sup> Concentración en ppm. Intervalo de confianza entre paréntesis.

<sup>b</sup> Pendiente. Desviación estándar ( $\pm$  DE) entre paréntesis.

<sup>c</sup> Factor de resistencia.

\* Cepa de referencia.

2003); es probable que esta diferencia se pueda asociar a la baja presión de selección ejercida en el norte peruano, comparada con el extensivo uso de temefos en países como Cuba.

El  $KDT_{50}$  encontrado para *Ae. aegypti* de la población Sullana es 106,31 min, lo cual indicaría la evolución de su resistencia a deltametrina (Tabla 2), que comparado con otras especies fue superior, como en *Anopheles gambiae* (Giles) de África de la localidad de Kao Koffikro que presentó un  $KDT_{50}$  de 78,7 min para este insecticida (Chandre *et al.* 1999) y *Aedes albopictus* (Skuse) que presentó un  $KDT_{50}$  aproximado de 53,66 min frente al piretroide cipermetrina (Sulaiman *et al.* 2002). Asimismo, en trabajos realizados en Malasia con los piretroides cipermetrina y ciflutrina en *Ae. albopictus*, la especie presentó susceptibilidad con porcentajes de mortalidad de 97,1 y 97,2%, respectivamente (Sulaiman *et al.* 2002), semejantes a los resultados encontrados en la población El Porvenir con un porcentaje de mortalidad de 99% frente a deltametrina. La resistencia a deltametrina presentada en la población Sullana, es el resultado de la presión de selección por el empleo de aspersiones de deltametrina en viviendas y, otra causa probable en forma indirecta de la presencia de resistencia de *Ae. aegypti* debido a los insecticidas empleados para el control de *Anopheles albimanus* (Wiedemann), principal vector de la malaria en el norte del Perú, ya que las viviendas se encuentran muy cercanas a los campos de cultivos, presentando esta especie, en la actualidad, resistencia a alfacipermetrina, lambdacialotrina, ciflutrina y deltametrina (CICE 2000).

En las tablas 1 y 2 se aprecia un valor mayor de la pendiente en las poblaciones El Porvenir y la cepa Rockefeller, siendo estas poblaciones más susceptibles a temefos y deltametrina que la población Sullana, por lo que cuanto más bajo sea el valor de la pendiente de la regresión, más heterogénea será la población y presentará una tendencia mayor a la resistencia (Bisset *et al.* 2001).

La banda que se distingue en la figura 1 en el gel de poliacrilamida (PAGE) pertenece sólo a la población El Porvenir, identificándose a la esterasa  $B_2$  con una movilidad relativa aproximada de 0,23, lo cual concuerda con lo señalado en trabajos previos para la población de El Porvenir, indicándose además la presencia de una esterasa  $A_2$  (Vargas *et al.* 2003). El resultado obtenido difiere con el tipo de esterasas detectadas en poblaciones de Venezuela y Cuba en donde el 98% de las poblaciones de *Ae. aegypti* estudiadas predomina la esterasa  $A_4$  con una movilidad relativa de 0,779 (Bisset *et al.* 2001), la cual estaría produciendo resistencia a organofosforados en estas regiones. Otros estudios en poblaciones de Venezuela detectaron la presencia de otra esterasa denominada  $A_6$  con una movilidad relativa de 0,61 (Bisset *et al.* 2001).

Ha sido demostrado la correlación existente entre la actividad de esterasas y la resistencia a insecticidas organofosforados (Bisset *et al.* 2001). En insectos, de los géneros *Culex*, *Anopheles*, *Blatella* y *Pediculus* el mecanismo más común de resistencia a insecticidas organofosforados involucra la presencia de una o más esterasas (Amevigbe *et al.* 2000; Chandre *et al.* 1999).

La probable intervención de las esterasas en la resistencia cruzada a piretroides ha sido señalada en *Culex quinquefasciatus* (Say) a través de estudios con sinergistas, detectándose juntos a las esterasas  $B_1$ ,  $A_6$ ,  $B_6$ , ya habiéndose registrado previamente también en áfidos (Bisset *et al.* 1996). Otro mecanismo de resistencia a piretroides es la aparición del gen *kdr*, y la presencia de oxidasas del citocromo P-450. El primero se debe al producirse un simple cambio de

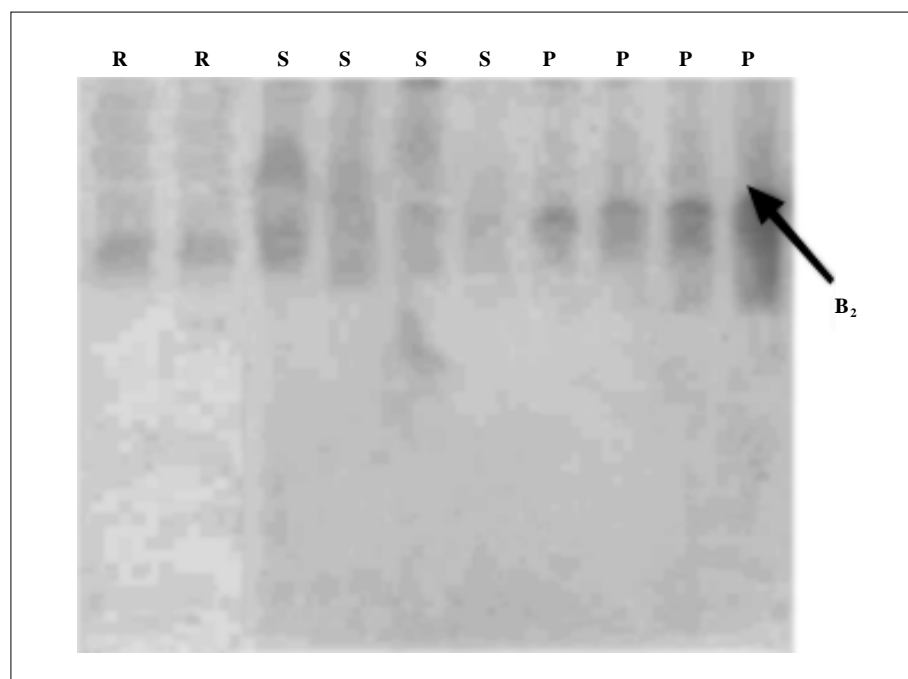


Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) mostrando patrones de bandas de esterasa  $B_2$  relacionada con la resistencia a organofosforados.

R = Rockefeller, S = Sullana y P = El Porvenir.

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad, tiempo "knockdown" ( $KDT_{50}$  y  $KDT_{95}$ ), valor de la pendiente de regresión y estado de resistencia en poblaciones coleccionadas en el 2002 de *Aedes aegypti* (adultos) usando tubos de prueba de la OMS

Deltametrina 0,025%					
Población	% Mortalidad	$KDT_{50}^a$ (min)	$KDT_{95}^a$ (min)	$b^b$	Estado de Resistencia
Sullana	68 (100) <sup>c</sup>	106,31	313,02	3,49 ( $\pm$ 0,55)	Resistente
El Porvenir	99 (100)	36,95	101,95	3,72 ( $\pm$ 0,27)	Susceptible
Rockefeller <sup>d</sup>	100 (100)	27,10	41,02	4,10 ( $\pm$ 0,38)	Susceptible

<sup>a</sup> Tiempo en minutos

<sup>b</sup> Pendiente. Desviación estándar ( $\pm$  DE) entre paréntesis.

<sup>c</sup> Número de mosquitos hembras utilizados para los bioensayos.

<sup>d</sup> Cepa de referencia.

algún aminoácido en el sitio de anclaje del insecticida en el canal de sodio (CICE 2000), y el segundo es un mecanismo de detoxificación mediante oxidaciones e hidroxilaciones (Bisset 2002). Se ha indicado que, en poblaciones de Brasil y Vietnam, la causa de resistencia a piretroides y DDT es la presencia del gen *kdr* (Bregues *et al.* 2003), de lo cual se infiere que éste sería el mecanismo probable que estuviera interviniendo en la resistencia a deltametrina en la población Sullana de *Ae. aegypti* al no detectarse bandas de esterases  $B_1$  y  $B_6$ .

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican la necesidad de realizar monitoreos para determinar los niveles de resistencia en poblaciones naturales, pues *Ae. aegypti* podría convertirse en una seria amenaza para las operaciones de control químico.

### Conclusiones

- El insecticida temefos puede seguir siendo utilizado en los programas de control del vector *Aedes aegypti* al mostrar esta especie aún susceptibilidad a este organofosforado, caso contrario sucede para deltametrina donde se debe evaluar su efecto en poblaciones naturales ya que algunas deben estar presentando resistencia como es el caso de la población Sullana.
- Por otro lado, la aparición de la esterasa  $B_2$  en la población El Porvenir representa un problema a futuro, ya que este tipo de enzima es la responsable de generar resistencia a los insecticidas organofosforados, debiéndose tomar las medidas necesarias para el caso.

### Literatura citada

AMEVIGBE, M. D. D.; FERRER, A.; CHAMPORIE, S.; MONTENY, N.; DEUNFF, J.; LENOBLE, D. 2000. Isoenzymes of human lice: *Pedicu-*

*lus humanus* and *Pediculus capitis*. Medical and Veterinary Entomology 14: 419-425.

BISSET, J. A. 2002. Uso correcto de insecticidas: Control de la resistencia. Revista Cubana Medicina Tropical 54 (3): 202-219.

BISSET, J. A.; DIÉGUEZ, L.; RODRÍGUEZ, M. M.; DÍAZ, C.; GONZÁLEZ, T.; VÁSQUEZ, R. 1996. Tres combinaciones de esterases y su relación con la resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides en *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) de Cuba. Revista Cubana Medicina Tropical 48(1): 150-155.

BISSET, J. A.; RODRÍGUEZ, M. M.; MOLINA, D.; DÍAZ, C.; SOCA, L. 2001. Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Aedes aegypti*. Revista Cubana Medicina Tropical 53(1): 37-43.

BRENGUES, C.; HAWKES, N.; CHANDRE, F.; MCCARROLL, L.; DUCHON, S.; GUILLET, P.; MANGUIN, S.; MORGAN, J.; HEMINGWAY J. 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. Medical and Veterinary Entomology 17 (1): 87-94.

BROWN, A. W. A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. Journal American Mosquito Control Association 2: 123-140.

CAMPOS, J.; ANDRADE, C. 2001. Suscetibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. Revista de Saúde Pública 35(3): 232-236.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN ENTOMOLÓGICA. 2000. Boletín trimestral 2 (2): 18-26.

CHANDRE, F.; DARRIER, F.; MANGA, L.; AKOGBETO, M.; FAYE, O.; MOUCHET, J.; GUILLET, P. 1999. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. Bulletin of World Health Organization 77 (3): 230-234.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. 1997. Bioquímica de Harper. 14 Edición. Editorial Manual Moderno. Argentina. 1021 p.

RAYMOND, M. 1985. Présentation d'un programme d'analyse log-probit pour microordinateur. Cahiers Orstrom. Series Entomology and Medical Parasitology 23: 117-121.

SCHNEIDER, J.; DROLL, D. 2001. A timeline for dengue in the Americas to December 31, 2000 and noted first occurrences. FAHO. Division of diseases prevention and control. 20 p.

SEVILLA A., C.; CÁCERES, A.; VAQUERIZO, A.; IBÁÑEZ, S.; SULCA, L. 2001. Reappearance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Lima, Perú. Memorias del Instituto Oswaldo Cruz 96 (5): 657-658.

SULAIMAN, S.; PAWANICHEE, Z.; OTHMAN, H.; SHAARI, N.; YAHAYA, S.; WABAB, A.; ISMAIL, S. 2002. Field evaluation of cypermethrin and cyfluthrin against dengue vectors in a housing estate in Malaysia. Journal of Vector Ecology 7 (2): 230-234.

VARGAS V, F.; ROLDÁN, J.; VERGARA, C.; CÓRDOVA, O.; BISSET, J.; RODRÍGUEZ, M. 2003. Detección de los niveles de resistencia de *Aedes aegypti* al temefos y evaluación de la efectividad biolarvívica de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. *israelensis*, Trujillo-La Libertad. Universidad Nacional de Trujillo. Informe al CONCYTEC. 53 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1981a. Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine, organophosphorous and carbamate insecticides. Unpublished document. WHO/VBC.81.806. 7 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1981b. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Unpublished document. WHO/VBC.81.807. 6 p.

Recibido: Ene. 15/2004

Aceptado: Oct. 07/2004