

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Estudio de la resistencia en una cepa de *Culex quinquefasciatus*, procedente de Medellín, Colombia

Dr. Juan Bisset,¹Lic. María Magdalena Rodríguez,²Lic. Cristina Díaz² y Téc. Alain Soca³

RESUMEN

Para conocer el estado de la resistencia en una cepa de *Culex quinquefasciatus*, procedente de una localidad de la ciudad de Medellín, Colombia, se determinaron los niveles de susceptibilidad y/o resistencia a 5 insecticidas organofosforados (malatión, metil-pirimifos, clorpirifos, temefos y fentión), 4 piretroides (cipermetrina, deltametrina, permetrina y lambdacialotrina) y un carbamato (propoxur). Se observó resistencia a todos los insecticidas organofosforados, aunque con valores relativamente menores para metil-pirimifos y fentión. No se encontró resistencia a los piretroides lambdacialotrina y cipermetrina, ni al carbamato propoxur, insecticidas que pueden ser muy útiles para el control de mosquitos de Colombia. Se demostró mediante el uso del sinergista piperonil butóxido que las oxidasas de función múltiple desempeñaron una función importante en la resistencia a los insecticidas organofosforados y piretroides. El uso del S.S.S. tributil fosfotriado reveló que la sobreproducción de esterasas inespecíficas constituyó un mecanismo de resistencia para los insecticidas organofosforados, excepto metil-pirimifos y para los piretroides excepto lambdacialotrina. Este resultado debe tenerse en cuenta en las estrategias que se vayan a usar para el control de *Culex quinquefasciatus* de Colombia. Estos 2 mecanismos de resistencia no son responsables de la resistencia al carbamato propoxur. El análisis electroforético reveló la presencia de las esterasas B1, A6 y B6, que presumimos tienen una función importante en la resistencia.

Descriptor DeCS: RESISTENCIA A INSECTICIDA; INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS; PIRETRINAS; CARBAMATOS; CONTROL DE MOSQUITOS; CULEX; COLOMBIA.

Culex quinquefasciatus Say, 1823, es un importante vector de la filariasis de Bancrofti, y desempeña una función importante en la transmisión de algunas encefalitis.¹ Es uno de los mosquitos que mejor se ha adaptado a las más diversas condiciones y modalidades del hábitat humano.²

Los insecticidas organofosforados han sido usados con amplitud para el control del complejo *Culex pipiens*, principalmente *Culex pipiens* y *Culex p. quinquefasciatus* en muchos países.³⁻⁷

Se han iniciado algunos estudios de resistencia a insecticidas y sus mecanismos bioquímicos para el control de *Aedes aegypti* en Colombia (comunicación personal), sin embargo, poco se conoce con respecto a esto en *Culex quinquefasciatus*.

En este trabajo nos trazamos como objetivo realizar un estudio completo de la resistencia en *Culex*

quinquefasciatus a diferentes grupos de insecticidas químicos, así como sus mecanismos de resistencia, con vistas a aportar información que contribuya al control de este vector en Colombia.

MÉTODOS

Se utilizaron 2 cepas de mosquitos:

- COLOMBIA. Una cepa de *Culex quinquefasciatus* obtenida en Medellín, Colombia, en 1995 y mantenida en el laboratorio sin presión de selección.
- S-LAB. Una cepa de *Culex quinquefasciatus* procedente de UC, Riverside, California, utilizada como cepa de referencia.

¹ Licenciado en Biología. Investigador Auxiliar.

² Licenciada en Bioquímica. Investigadora Agregada.

³ Técnico en Farmacia Industrial.

En los bioensayos se emplearon 5 réplicas correspondientes a dosis diferentes de cada concentración de insecticida (20 larvas por réplica), las cuales causaron entre 2 y 98 % de mortalidad. 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 acción de los sinergistas se determinó exponiendo las larvas a concentraciones subletales de S,S,S tributil fosfotriado (DEF) (0,4 mL de 0,01 %) y de piperonil butóxido (PB) (0,8 mL de 0,001 %) durante 4 h previo a la adición de los insecticidas. La lectura de las mortalidades se realizó a las 24 h, la CL_{50} y la CL_{90} se hallaron mediante un programa Probit-log.⁸

Las pruebas bioquímicas se realizaron en larvas de cuarto estadio, las muestras fueron homogeneizadas en 200 μ L de *buffer* fosfato (0,02 M; pH 7,5) a 4 °C de temperatura. Se determinó la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) normal e inhibida con propoxur según el método de Hemingway.⁹

La actividad de las esterases se determinó en las larvas individualmente según el método de Peiris & Hemingway.

En ambos casos se encontró la frecuencia de los genes de la resistencia, y se asumió que la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) 7,5 %, para la identificación de las esterases, se aplicaron 10 μ L de muestra + 10 μ L del marcador xilen cianol (0,02 % de xilen cianol en sacarosa al 15 %). La corrida se realizó a 200 V durante 1 h aproximadamente.

Para la coloración se sumergieron los geles en 50 mL de *buffer* fosfato que contenía 4 mL de cada uno de los sustratos inespecíficos de las esterases (α -naphthyl acetato y de β -naphthyl acetato) y se le añadió 0,5 g del colorante fast-blue RR. El gel se sumergió en ácido acético al 10 % para fijar la coloración de las bandas.

RESULTADOS

La cepa susceptible de referencia S-Lab, procedente de UC, Riverside, California fue testada para todos los insecticidas organofosforados, piretroides y para el carbamato propoxur (tabla 1) y se utilizó para el cálculo de los valores de FR_{50} y FR_{90} de la cepa de Colombia.

Resistencia a insecticidas organofosforados. En la tabla 2 se muestra el factor de resistencia (FR_{50} y FR_{90}) calculado a partir de los valores de CL_{50} y CL_{90} respectivamente, para los insecticidas organofosforados malatión, metil-pirimifos, clorpirifos, temefos y fentión. El valor de resistencia más elevado resultó el mostrado a temefos (Abate), con un valor de

TABLA 1. Valores de concentraciones letales (CL_{50} y CL_{90}) calculados para 3 insecticidas organofosforados (malatión, metil-pirimifos y clorpirifos), 4 piretroides (cipermetrina, deltametrina, permetrina y lambdacialotrina), y un carbamato (propoxur) en la cepa de *Culex quinquefasciatus* S-LAB

Insecticida	CL_{50}	CL_{90}	b*
Malatión	0,0139	0,06	2,01
Clorpirifos	0,00032	0,00079	3,24
Metil-pirimifos	0,064	0,122	4,55
Fentión	0,031	0,054	5,30
DDT	1,38	21,01	1,083
Deltametrina	0,00023	0,001	1,974
Lambdacialotrina	0,00529	0,0135	3,13
Cipermetrina	0,0016	0,0119	1,45
Propoxur	0,778	1,396	5,049
Abate	0,00015	0,001	2,01
Permetrina	0,0055	0,014	3,03

* Valores de la pendiente de la línea de regresión Probit-log.

FR_{50} de 533x, seguido de clorpirifos 212,5x y malatión 33,81x, lo cual puede ser el resultado de las actuales medidas de control de vectores en Colombia, que incluyen el uso de temefos para el control de larvas de *Aedes aegypti* y malatión en rociado espacial para los adultos. Se observó menor resistencia a metil-pirimifos y fentión, lo cual los hace buenos candidatos para el uso como insecticidas alternativos para el control de esta especie en Colombia. Los valores altos de las pendientes (b*), observados para todos los organofosforados indicó que la resistencia a estos insecticidas es estable y homogénea.

Resistencia a insecticidas piretroides. En la tabla 2 se muestran los niveles de susceptibilidad y/o resistencia para los insecticidas piretroides cipermetrina, deltametrina, permetrina y lambdacialotrina. Sólo se encontró resistencia a deltametrina y permetrina, con valores de FR_{50} de 12,17x y 16,93x respectivamente, lo cual indica que estos insecticidas resultan inefectivos para el control de esta especie en Colombia. Sin embargo, no se observó resistencia a cipermetrina ni a lambdacialotrina, con valores de FR_{50} de 0,538 y 0,57 respectivamente, insecticidas que pueden ser muy útiles para el control de vectores en Colombia, ya sea de forma individual o alternados; por ejemplo, con insecticidas organofosforados como metil-pirimifos y fentión.

Determinación in vivo del mecanismo de resistencia de oxidasas de función múltiple. Las enzimas oxidasas de función múltiple (OFM) constituyen un mecanismo de resistencia para el insecticida piretroide permetrina (tabla 3), con un valor de FS mayor que 5 (5,81); sin embargo, desempeña una insignificante función para los insecticidas organofosforados temefos (FS de 1,95) y clorpirifos (FS de 1,41) y el carbamato propoxur (FS de 2,73) No tiene ninguna función en la resistencia a los

organofosforados (malatión, metil-pirimifos y fentión), ni para los piretroides deltametrina, cipermetrina y lambdacialotrina con valores de factor de sinergismo (FS) menores que 1.

Determinación in vivo del mecanismo de resistencia de esterasa. Se utilizó el sinergista S,S,S tributil fosfotriado, los resultados se muestran en la (tabla 4). Como muestra esta tabla, los valores del factor de sinergismo resultaron elevados para todos los insecticidas organofosforados, el que resultó menos afectado fue el metil-pirimifos con un valor de FS de 5,13: lo cual nos indica que las esterasas desempeñan una función importante en la resistencia de *Culex quinquefasciatus* en Colombia a los insecticidas malatión (FS: 6,26), clorpirifos (FS: 15,45), temefos (FS: 43) y fentión (FS: 19,54).

Las esterasas no tienen una función importante en la resistencia a deltametrina y cipermetrina, con valores de FS menores que 1 (0,58 y 0,13), respectivamente; sin embargo, sí lo son en la resistencia a permetrina y lambdacialotrina, con valores de FS de 155 y 10.

Determinación in vitro de la frecuencia genotípica en los mecanismos de resistencia de esterasas y acetilcolinesterasa. En la cepa de *Culex quinquefasciatus* de Medellín, la frecuencia de esterasas fue elevada (1) y no resultó así para la AchE (0,3). Estos resultados explican la resistencia observada a los diferentes grupos de insecticidas testados, afectados por estos mecanismos de resistencia (por ejemplo, la baja resistencia a propoxur está bien relacionada con la baja frecuencia de AchE), aunque pueden estar operando también otros mecanismos de resistencia no identificados.

TABLA 2. Valores de concentraciones letales (CL_{50} y CL_{90}) observados en una cepa de *Culex quinquefasciatus* procedente de Medellín, Colombia; así como los valores del factor de resistencia (FR_{50} y FR_{90}), para 3 insecticidas organofosforados (malatión, metil-pirimifos y clorpirifos), 4 piretroides (cipermetrina, deltametrina, permetrina y lambdacialotrina) y 1 carbamato (propoxur)

Insecticida	CL_{50}	FR_{50}	CL_{90}	FR_{90}	b^*
Malatión	0,47	33,81	0,66	11,00	8,69
Metil-pirimifos	0,39	6,09	0,56	4,59	8,06
Clorpirifos	0,068	212,05	0,098	124,05	8,21
Temefos	0,086	573,33	0,216	216,00	3,229
Fentión	0,215	6,93	0,375	6,94	5,33
Cipermetrina	0,00084	0,538	0,0021	0,17	3,13
Deltametrina	0,0028	12,17	0,009	9,00	2,44
Permetrina	0,093	16,93	0,329	22,68	2,33
Lambdacialotrina	0,003	0,57	0,0059	0,45	4,55
Propoxur	0,66	0,84	0,927	0,66	8,71

* Valores de la pendiente de la recta de regresión.

TABLA 3. Valores de CL_{50} y CL_{90} y factor de sinergismo (FS), calculados para 5 insecticidas organofosforados (malatión, metil-pirimifos, temefos, fentión y clorpirifos), 4 piretroides (deltametrina, permetrina, cipermetrina y lambdacialotrina) y un carbamato (propoxur), en una cepa de Medellín, Colombia, mediante el sinergista piperonil butóxido (PB)

Insecticida	CL_{50} (mg/L)	FS	CL_{90} (mg/L)	b^*
Malatión	0,79	0,59	1,09	9,14
Metil-pirimifos	1,67	0,23	4,77	2,82
Temefos (Abate)	0,044	1,95	0,074	5,56
Fentión	0,76	0,28	2,47	2,50
Clorpirifos	0,048	1,41	0,066	9,24
Deltametrina	0,0035	0,8	0,011	2,58
Permetrina	0,016	5,81	0,037	3,46
Cipermetrina	0,0031	0,27	0,0087	2,86
Lambdacialotrina	0,0015	2,0	0,0042	2,94
Propoxur	0,241	2,73	1,096	1,98

* Valores de la pendiente de la recta de mortalidad vs. dosis.

FS= CL_{50} insecticida solo/ CL_{50} insecticida + sinergista.

TABLA 4. Valores de CL₅₀ y CL₉₀ y factor de sinergismo (FS), calculados para 5 insecticidas organofosforados (malatión, metil-pirimifos, clorpirifos, abate y fentión), 4 piretroides (permetrina, deltametrina, cipermetrina y lambdacialotrina) y un carbamato (propoxur), valores de la pendiente (b) en una cepa de Medellín, Colombia, mediante el sinergista S,S,S tributil fosfotritiado (DEF)

Insecticida	CL ₅₀ (p.p.m.)	FS ₀	CL ₉₀ (p.p.m.)	b
Malatión	0,075	6,26	0,13	5,39
Metil-pirimifos	0,076	5,13	0,129	5,62
Clorpirifos	0,0044	15,45	0,0077	5,35
Temefos (Abate)	0,002	43,043	0,007	2,24
Fentión	0,011	19,54	0,051	1,97
Permetrina	0,006	155	0,070	1,19
Deltametrina	0,0048	0,58	0,0076	6,47
Cipermetrina	0,0062	0,13	0,013	4,02
Lambdacialotrina	0,0003	10	0,0071	3,45
Propoxur	0,420	1,57	1,214	3,57

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida para determinar el tipo de esterasa involucrada en la resistencia a insecticidas en la capa de Medellín, Colombia. En la figura se representa el zimograma donde se observan las esterases B1-A6-B6.

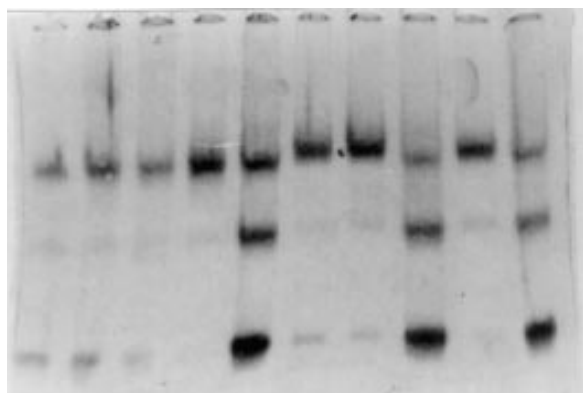


Fig. Esterasas presentes (B1-A6-B6) en una cepa de *Culex quinquefasciatus*, procedente de Medellín, Colombia.

DISCUSIÓN

En trabajos realizados en *Culex quinquefasciatus* de Cuba,^{5,11,12} entre los insecticidas organofosforados probados, metil-pirimifos resultó el de más baja resistencia, y que no fue afectado por los mecanismos de resistencia a malatión, se recomendó también como insecticida alternativo para el control de vectores en Cuba.

Los insecticidas piretroides resultan la esperanza en el control químico de vectores, pero su uso en los

últimos años ha generado resistencia a alguno de ellos, como es el caso de la deltametrina, todavía resultan muy eficaces otros como lambdacialotrina y cipermetrina.¹²

En estudios realizados en *Culex quinquefasciatus* de Cuba se han reportado las OFM como mecanismo de resistencia tanto para insecticidas organofosforados como piretroides, con valores elevados de FS y no constituye un mecanismo de resistencia para el carbamato propoxur.¹¹⁻¹³

El papel de la esterasa B1 en la resistencia a los insecticidas organofosforados está bien documentado,¹³ y se conoce que no interviene en la resistencia a los piretroides.^{14,15} La esterasa B1 combinada con las esterases A6 y B6 parece estar asociada con la resistencia a piretroides, no sólo en Colombia, sino también en Cuba,^{11,12} y Venezuela (datos sin publicar).

En trabajos realizados en *Culex quinquefasciatus* de Cuba, también se ha asociado la resistencia a piretroides (deltametrina y lambdacialotrina), no a cipermetrina, con el mecanismo de esterases mediante el uso de sinergistas.¹² El insecticida organofosforado propoxur no resultó afectado por el mecanismo de esterases (FS: 1,57).

SUMMARY

The levels of susceptibility and/or resistance to 5 organophosphate insecticides (malathion, methyl-pyrimifos, clorpirifos, temephos and fenthion), 4 pyrethroids (cypermethrin, deltamethrin, permethrin and lambda-cyhalothrin), and a carbamate (propoxur) were determined in order to know the state of resistance in a strain of *Culex quinquefasciatus* from a locality of the city of Medellín, Colombia. Resistance to all organophosphate insecticides, though with relatively lower values for methylpyrimifos and fenthion, was observed. No resistance to

lambda-cyhalothrin and cypermethrin or to propoxur was found. These insecticides may be useful for the control of mosquitoes in Colombia. It was demonstrated by using the piperonyl butoxide synergist that the oxidases of multiple function played an important role in the resistance to organophosphate insecticides and pyrethroids. The utilization of S.S.S. tributyl phosphotriate revealed that the superproduction of unspecific esterases was a mechanism of resistance to organophosphate insecticides, except methyl-pirimifos and for perythroids, except lambda-cyhalothrin. This result should be taken into consideration for the strategies to be used to control *Culex quinquefasciatus* in Colombia. These two mechanism of resistance are not responsible for the resistance to propoxur. The electrophoretic analysis showed the presence of esterases B1, A6 and B6, which seem to have an important function in resistance.

Subject headings: INSECTICIDE RESISTANCE; INSECTICIDES ORGANOPHOSPHATE; PYRETHRINS; CARBAMATES MOSQUITO CONTROL; CULEX; COLOMBIA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Subra. Biology and control of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) with special reference to Africa. *Insect Sci Appl* 1981;1:319-38.
2. Pérez Viguera I. Los ixódidos y culicidos de Cuba. Su historia natural y médica. La Habana: Universidad de La Habana, 1956;363-6.
3. Pasteur N, Iseki A, Georghiou GP. Genetic and biochemical studies of the highly active esterases A and B associated with organophosphate resistance in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex. *Biochem Genet* 1981;19:909-19.
4. Raymond M, Fournier D, Bride JM, Cuany A, Berge J, Magnin M, et al. Identification of resistance mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from southern France: insensitive acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. *J Econom Entomol* 1986;79:1452-8.
5. Bisset JA, Rodríguez MM, Díaz C, Ortiz E, Marquetti MC, Hemingway J. The mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* from Cuba. *Bull Entomol Res* 1990;80:245-50.
6. Poirie M, Raymond M, Pasteur M. Identification of two distinct amplifications of the esterase B locus in *Culex pipiens* (L.) mosquitoes from Mediterranean countries. *Biochem Genet* 1992;30:13-26.
7. Bourguet D, Capela R, Raymond M. An insensitive acetylcholinesterase in *Culex pipiens* L. mosquitoes from Portugal. *J Econom Entomol* 1996;89:1060-6.
8. Raymond M. Presentation d un programme d analyse log-probit pour microordinateur. *Cathiers. Orstom S'r Ent M'd Parasitol* 1985;23:117-21.
9. Hemingway J, Smith C. Field and laboratory detection of the altered acetylcholinesterase resistance genes which confer organophosphate and carbamate resistance in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Bull Ent Res* 1986;76:559-65.
10. Peiris HTR, Hemingway J. Mechanisms of insecticide resistance in a temphos selected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) strain from Sri Lanka. *Bull Entomol Res* 1990;80:49-55.
11. Bisset JA, Rodríguez MM, Dayamí L. Determinación de los mecanismos de resistencia en *Culex quinquefasciatus*, Say 1823 y su implicación operacional en el uso correcto de insecticidas para el control. *Rev Cubana Med Trop* 1994;46:108-14.
12. Rodríguez MM, Bisset J, Mastrapa L, Díaz C. Asociación de la resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides con los mecanismos de resistencia observados en cepas de *Culex quinquefasciatus* de Ciudad de La Habana. *Rev Cubana Med Trop* 1995;47:154-160.
13. Georghiou GP, Pasteur N. Electrophoretic esterase patterns in insecticide resistant and susceptible mosquitoes. *J Econ Entomol* 1978;71:201-5.
14. Raymond M, Pasteur N, Georghiou GP, Mellon RB, Wirth MC, Hawkley M. Detoxification esterases new to California, USA, in organophosphate resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 1987;24:24-9.
15. Hemingway J, Callaghan A, Amin A. Mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* from Saudi Arabia. *Med Vet Entomol* 1990;4:275-82.

Recibido: 11 de junio de 1997. Aprobado: 26 de diciembre de 1997.

Lic. *Juan Bisset*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.