

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Caracterización de la resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides en *Culex quinquefasciatus* del Estado de Miranda, Venezuela

Lic. Juan A Bisset,<sup>1</sup> Lic. María Magdalena Rodríguez,<sup>2</sup> Lic. Cristina Díaz<sup>3</sup> y Téc. Lázaro Alain Socá<sup>4</sup>

### RESUMEN

La resistencia a los insecticidas organofosforados malatión y clorpirifos resultó ser mayor de 30 x, y la resistencia a metil-pirimifos, fentión (OPs), cipermetrina, deltametrina, permetrina y lambdacialotrina (piretroides) y DDT (organoclorado) resultó ser menor de 4x en *Culex quinquefasciatus* de Miranda, Venezuela. Se investigaron los mecanismos de resistencia con el sinergista piperonil butóxido (PB, enzimas oxidasas de función múltiple) y S,S,S tributil fosfotriado (DEF, inhibidor de las enzimas esterasas). Las enzimas oxidasas de función múltiple no jugaron una función significativa en la resistencia a insecticidas organofosforados, y 1 carbamato, las esterasas resultaron sólo mecanismos de resistencia a malatión y clorpirifos (OPs). El único insecticida piretroide que resultó afectado por el DEF y PB fue la *cipermetrina*. Las *pruebas bioquímicas* revelaron muy baja frecuencia del mecanismo de acetilcolinesterasa alterada (0,13). La frecuencia de esterasas resultó elevada (1). Las electroforesis revelaron los fenotipos de esterasas B1, A6 y B6.

**Descriptores DeCS:** RESISTENCIA A INSECTICIDA; INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS; REACCIONES BIOQUIMICAS; AEDES.

El dengue y su forma severa, fiebre hemorrágica del dengue (FHD) constituyen un problema de salud creciente en muchos países de Latinoamérica. En las Américas la FHD apareció en Cuba con 344 000 casos y 158 muertos,<sup>1</sup> seguido por Venezuela en 1989 con 12 000 casos de los cuales 3 108 fueron FHD. Cada año en Venezuela se continúan reportando casos de dengue y FHD.<sup>2</sup> El control de la enfermedad se ha logrado mediante el control del vector *Aedes aegypti*.

Por la necesidad de erradicar el *A. aegypti* en Venezuela, se han realizado trabajos sobre la susceptibilidad y/o resistencia a los diferentes grupos de insecticidas químicos, así como sus mecanismos de resistencia.<sup>3</sup> En Cuba, el control de esta especie

en los criaderos urbanos facilitó el reemplazo interespecífico de esta especie por *Culex quinquefasciatus*.<sup>4</sup> El control de esta especie en los criaderos urbanos no reduce significativamente las densidades de *C. quinquefasciatus*.

*Culex quinquefasciatus* Say, 1823, además de ser un mosquito que causa molestias al hombre, es un importante vector de la filariasis de Bancrofti, y desempeña una función importante en la transmisión de algunas encefalitis.<sup>5</sup> Es uno de los mosquitos que mejor se ha adaptado a las más diversas condiciones y modalidades del hábitat humano.<sup>6</sup> Este estudio tiene 2 objetivos: caracterización del estado de la resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides en *Culex quinque-*

<sup>1</sup> Licenciado en Biología. Investigador Auxiliar.

<sup>2</sup> Licenciada en Bioquímica. Investigadora Agregada.

<sup>3</sup> Licenciada en Bioquímica. Aspirante a Investigadora.

<sup>4</sup> Técnico en Farmacia Industrial.

*fasciatus* de Venezuela y la identificación de los mecanismos responsables de la resistencia.

## MÉTODOS

Se utilizaron 2 cepas de mosquitos:

- Miranda: una cepa de *Culex quinquefasciatus* obtenida de Miranda, Venezuela 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 susceptible de referencia.

En los bioensayos se emplearon 5 réplicas de cada concentración de insecticida (20 larvas por réplica), las cuales causaron entre un 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 DEF (0,4 mL de 1 ppm) y el PB (0,8 mL de 0,1 ppm) durante 4 h previo a la adición de los insecticidas. La lectura de las mortalidades se realizó a las 24 h, se hallaron la  $CL_{50}$  y la  $CL_{90}$  a través de un programa Probit-log.<sup>7</sup>

Las pruebas bioquímicas se realizaron en larvas de cuarto estadio, las muestras fueron homogeneizadas en 200 mL de *Buffer* fosfato (0,02 M; pH 7,5) a 4 EC de temperatura. Se determinó la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) normal e inhibida con propoxur según el método de Hemingway.<sup>8</sup>

La actividad de las esterasas se determinó individualmente en las larvas según el método de Peiris & Hemingway.<sup>9</sup>

Se determinó en ambos casos la frecuencia de los genes de la resistencia según la fórmula de equilibrio de Hardy-Weinberg.

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) para la identificación de las esterasas, no se utilizó gel concentrador, sólo un gel de corrida de 7,5 %. Se aplicaron 10 mL de muestra + 10 mL del marcador xilen cianol (100 mL de xilen cianol 1 %

en 50 mL de sacarosa 5 %). 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 esterasas ( $\alpha$ -naftilacetato y de  $\beta$ -naftilacetato), y se añadió 0,5 g del colorante fast-blue RR. El gel se sumergió en ácido al 10 % para fijar la coloración de las bandas.

## RESULTADOS

La cepa susceptible de referencia S-lab fue probada para todos los insecticidas organofosforados, para el carbamato propoxur y el organoclorado DDT (tabla 1) y se utilizó para el cálculo de los valores de  $FR_{50}$  y  $FR_{90}$  de la cepa de Miranda, Venezuela.

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

Insecticida	$CL_{50}$ (ppm)	$CL_{90}$ (ppm)	b
Malatión	0,0139	0,06	2,01
Clorpirifos	0,00032	0,00079	3,24
Metil-pirimifos	0,064	0,122	4,55
Fentiión	0,031	0,054	5,30
Cipermetrina	0,0016	0,0119	1,45
Deltametrina	0,00023	0,001	1,974
Permetrina	0,0055	0,014	3,03
Lambdacialotrina	0,0053	0,013	3,13
Propoxur	0,778	1,396	5,049
DDT	1,38	21,01	1,083

b: Valores de la pendiente de la línea de regresión Probit-log.

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 y fentiión. Se observaron valores de resistencia mayores que 30x para el malatión y clorpirifos, con valores de 33,81 y 34,87 respectivamente, sin embargo, se observó resistencia baja con valores menores que 5x para metil-pirimifos y fentiión, con

**TABLA 2.** Valores de concentraciones letales ( $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  observados en una cepa de *Culex quinquefasciatus* procedentes de Miranda, Venezuela, y valores del factor de resistencia (FR) correspondiente ( $FR_{50}$  y  $FR_{90}$ ), para 4 insecticidas (malatión, metil-pirimifos, fentión y clorpirifos), 4 piretroides (cipermetrina, deltametrina, permetrina y lambdacialotrina), 1 carbamato (propoxur) y 1 organoclorado DDT

Insecticida	$CL_{50}$ (ppm)	$FR_{50}$	$CL_{90}$ (ppm)	$FR_{90}$	b
Malatión	0,47	33,81	0,66	11,0	8,69
Clorpirifos	0,011	34,37	0,022	27,84	4,13
Metil-pirimifos	0,093	1,453	0,161	1,32	5,34
Fentión	0,068	2,19	0,169	3,12	3,25
Cipermetrina	0,0028	1,79	0,012	1,0	1,96
Deltametrina	0,00072	3,13	0,0026	2,6	2,31
Permetrina	0,0092	1,67	0,02	1,37	3,8
Lambdacialotrina	0,001	0,18	0,0028	0,21	2,99
Propoxur	2,82	3,62	10,99	7,87	2,17
DDT	0,21	0,15	1,12	0,053	1,76

b: Valores de la pendiente de la recta de regresión.

valores de  $FR_{50}$  de 1,45x y 2,19x respectivamente. Los valores altos de las pendientes (b), observados para todos los organofosforados indicaron que son poblaciones homogéneas para la resistencia.

Resistencia a insecticidas piretroides. En la tabla 2 también se muestran los niveles de susceptibilidad y/o resistencia para los insecticidas piretroides cipermetrina, deltametrina, permetrina y lambdacialotrina. Se observó resistencia relativamente baja, menor que 5x para cipermetrina, deltametrina y permetrina, con valores de  $FR_{50}$  de 1,79; 3,13 y 1,67 respectivamente, no se observó resistencia a lambdacialotrina (0,18x), además, los valores altos de la pendiente indican que son poblaciones muy homogéneas y estables para la resistencia.

No se observó resistencia al insecticida organoclorado DDT en la cepa de *C. quinquefasciatus* de Venezuela.

*Determinación in vivo del mecanismo de resistencia de oxidasas de función múltiple.* Se realizaron las pruebas con sinergistas para todos los insecticidas aun cuando la resistencia resultó menor que 5, para conocer sus mecanismos responsables (tabla 3). Las enzimas oxidasas de función múltiple OFM constituyen un mecanismo de resistencia para el insecticida piretroide cipermetrina con un valor de 28 x. Los valores del factor de sinergismo (FS) menores que 5 para el resto de los insecticidas organofosforados y piretroides indicaron que las OFM juegan un insignificante o escaso papel en la resistencia a estos insecticidas.

**TABLA 3.** Valores de  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  y factor de sinergismo (FS), con la utilización del sinergista piperonil butóxido (PB) en *Culex quinquefasciatus* de Miranda, Venezuela

Insecticida	$CL_{50}$ (mg/L)	FS	$CL_{90}$ (mg/L)	b
Malatión	0,287	1,63	0,624	3,79
Metil-pirimifos	0,096	0,96	0,182	4,61
Clorpirifos	0,0057	1,92	0,0097	5,52
Fentión	0,028	2,42	0,05	5,12
Deltametrina	0,00065	1,10	0,0028	2,008
Cipermetrina	0,0001	28,0	0,00069	1,52
Permetrina	0,0063	1,46	0,015	3,33
Lambdacialotrina	0,0037	0,27	0,06	1,059
Propoxur	0,877	3,21	1,68	4,53
DDT	0,412	0,50	2,52	1,62

FS =  $CL_{50}$  del insecticida/ $CL_{50}$  del insecticida + sinergista PB.

**TABLA 4.** Valores de  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$ , y factor de sinergismo (FS), con la utilización del sinergista S,S,S tributil fosfotriado (DEF) en *Culex quinquefasciatus* de Miranda, Venezuela

Insecticida	$CL_{50}$ (mg/L)	FS	$CL_{90}$ (mg/L)	b
Malatión	0,168	17,0	0,431	3,129
Metil-pirimifos	0,039	2,38	0,0092	3,48
Clorpirifos	0,00025	44,0	0,00048	4,52
Fentión	0,041	1,65	0,137	2,46
Deltametrina	0,00042	1,71	0,0014	2,40
Cipermetrina	0,00007	4,0	0,00023	2,51
Permetrina	0,0028	3,28	0,0089	2,53
Lambdacialotrina	0,00039	2,56	0,0018	1,89
Propoxur	1,17	2,41	2,65	3,63
DDT	0,832	0,25	8,38	1,27

FS =  $CL_{50}$  del insecticida /  $CL_{50}$  del insecticida + sinergista PB.

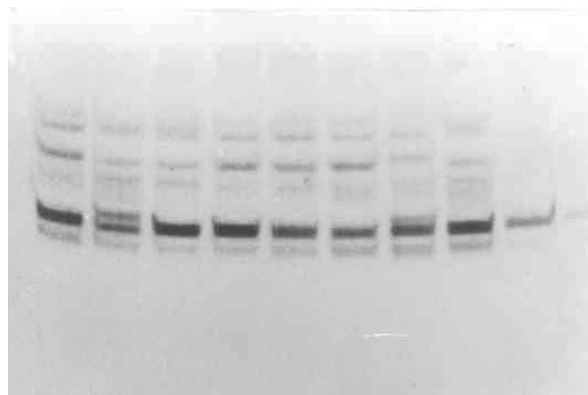
*Determinación in vivo del mecanismo de resistencia de esterasas.* Se utilizó el sinergista S,S,S tributil fosfotriado (DEF), los valores del factor de sinergismo (tabla 4) resultaron elevados sólo para malatión y clorpirifos, con valores de 17x y 44x, respectivamente. Sin embargo, para metil-pirimifos y fentión se observaron valores muy bajos FS= 2,38 y 1,65 respectivamente, lo cual nos indica que las esterasas desempeñan una función importante en la resistencia en *Culex quinquefasciatus* de Venezuela a los insecticidas malatión y clorpirifos, metil-pirimifos y fentión no se ven afectados por este mecanismo de resistencia.

Las esterasas no juegan una función importante en la resistencia piretroide con valores de FS menores que 5, ni tampoco resultó afectado por este mecanismo el insecticida carbamato propoxur (FS=2,41).

*Determinación in vitro de la frecuencia genotípica de los mecanismos de resistencia de esterasas y acetilcolinesterasas.* El valor de frecuencia de esterasas resultó elevado (1), no así para la AchE (0,3). Estos resultados explican la resistencia observada a los diferentes grupos de insecticidas probados, afectados por estos mecanismos de resistencia (por ejemplo la baja resistencia propoxur está bien relacionada con la baja frecuencia de AchE), la alta frecuencia de esterasas explica también la alta resistencia observada a malatión y clorpirifos.

En la electroforesis se revelaron 3 fenotipos de esterasas B1, A6 y B6, estas esterasas aparecen como mecanismo de resistencia en *Culex*

*quinquefasciatus* de Cuba,<sup>10-14</sup> de Colombia y Brasil (datos sin publicar), aunque la actividad de estas esterasas en el gel de poliácridamida es mucho mayor que la actividad observada en la cepa de Miranda, Venezuela. Al presentarse estas esterasas a baja actividad en la cepa Miranda pudiera explicarse el bajo valor de FS observado con insecticidas piretroides (fig.).



**Fig.** Esterasas presentes (B1-A6-B6) en una cepa de *Culex quinquefasciatus*, procedentes de Miranda, Venezuela.

## DISCUSIÓN

Los valores de resistencia observados en la cepa de Miranda, Venezuela a insecticidas organofosforados pueden ser el resultado de las actuales medidas de control de vectores en Venezuela, que incluyen el uso de organofosforados para el control de larvas, y malatión en nebulización

térmica, y ultra bajo volumen para el control de adultos, lo cual ha generado genes de resistencia que al parecer no ofrecen resistencia cruzada a metil-pirimifos y fentión. Estos 2 insecticidas OP pueden ser aun efectivos para el control de esta especie en Venezuela. En trabajos realizados en Cuba,<sup>10-12</sup> dentro de los insecticidas organofosforados probados metil-pirimifos resultó ser el de más baja resistencia, recomendándose también como insecticida alternativo para el control.

En los últimos 4 años se han incorporado insecticidas piretroides en los programas de control de vectores en Venezuela. En estudios realizados en *Aedes aegypti* de Miranda, Venezuela, se encontró también que no existió resistencia al insecticida piretroide lambdacialotrina,<sup>3</sup> lo cual indica que puede ser muy útil para el control de vectores en Venezuela ya sea individual o alternado, por ejemplo, con insecticidas organofosforados como metil-pirimifos y fentión.

No se encontró resistencia cruzada a DDT, sin embargo, *Aedes aegypti* en Venezuela mostró resistencia a este insecticida,<sup>13</sup> ya que el uso del DDT se suspendió al principio de los años 60, pero se continúa utilizando en el control de vectores de otras enfermedades endémicas, como por ejemplo malaria.

En estudios realizados en *Culex quinquefasciatus* de Cuba se han reportado a las OFM como mecanismo de resistencia tanto para insecticidas organofosforados como piretroides, con valores elevados de FS, los valores más elevados se observan para cipermetrina.<sup>11,12</sup>

Está bien establecido que el mecanismo de resistencia al organoclorado DDT lo constituye la enzima de hidrolinasa que hidroliza el DDT a DDE, se demostró que la OFM no constituye mecanismo de resistencia a este insecticida.

Las esterasas no constituyen un mecanismo de resistencia a metil-pirimifos, similares resultados se han observado en cepas cubanas de *C. quinquefasciatus*<sup>11,12</sup> donde las esterasas constituyen mecanismos de resistencia para malatión y clorpirifos, pero no para metil-pirimifos.

En trabajos realizados en *C. quinquefasciatus* de Cuba, se ha asociado la resistencia a piretroides: deltametrina, lambdacialotrina y cipermetrina con el

mecanismo de esterasas a través del uso de sinergistas.<sup>11,12</sup>

Se ha determinado con certeza que la resistencia al insecticida propoxur es debida al mecanismo de la acetilcolinesterasa modificada (AChE).<sup>10</sup>

Los resultados obtenidos en la cepa Miranda no coinciden con los obtenidos en las cepas de *Culex quinquefasciatus* de Cuba, Colombia y Brasil, donde se asocian la aparición de las esterasas A6 y B6 asociadas con la B1, con la resistencia a insecticidas piretroides, debido al alto valor de sinergismo observado con estos insecticidas y DEF.

En Cuba, mientras existió en las poblaciones cubanas B1 solamente no se había reportado resistencia piretroide.<sup>10</sup> Estas 2 esterasas aparecen en Cuba después de 1986, cuando el malatión fue reemplazado por el uso de insecticidas piretroides. Si la presencia de estas esterasas B1, A6 y B6, en poblaciones de *Culex quinquefasciatus* de países de América Latina es el resultado de la presión de selección con insecticidas o se debe a migración, es una interrogante actual.

La aparición de estas esterasas, aunque a baja efectividad representa un problema, si no se comienza a utilizar un insecticida organofosforado alternado con piretroides, para de esta forma evitar que la resistencia a piretroides se convierta en un fenómeno irreversible, ya que estas esterasas A6 y B6 que comienzan a manifestarse en Venezuela a baja actividad son las mismas esterasas, al parecer responsables de la resistencia a piretroides en Cuba, Colombia, Brasil, Trinidad y puede resultar para las Américas también.

Se recomienda el uso alternado de metil-pirimifos, un insecticida organofosforado no afectado por el mecanismo de resistencia de esterasas inespecíficas (específicamente B1, A6 y B6) con piretroides para retardar o dilatar la aparición de resistencia a estos insecticidas en Venezuela.

## SUMMARY

Resistance of *Culex quinquefasciatus* from Miranda, Venezuela to the organophosphate insecticides malathion and chlorpirifos was higher than 30 x whereas resistance to pyrethroids metylpirimifos, fention, cipametrine, deltametrine, permethrine and

lambda-cyhalothrin and to organochlorate DDT was lower than 4x. Resistance mechanisms were analyzed with piperonyl butoxide synergist (multifunction oxidases) and S.S.S. phosphotriphate tributyl (DEF, esterase inhibitor). Multifunction oxidases did not play a significant role in resistance to organophosphate insecticides and carbamate; however, esterases were only mechanisms of resistance to malathion and chlorpirifos. The only insecticide affected by DEF and PB was cipermetrine. Biochemical tests revealed a very low frequency of the altered acetylcholinesterase mechanism (0,13). Esterase frequencies were high (1). Electrophoresis exposed the B1, A6 and B6 esterase phenotypes.

**Subject headings:** INSECTICIDE RESISTANCE; INSECTICIDES: ORGANO PHOSPHATE; BIOCHEMICAL REACTION; AEDES.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tonn RJ, Figueredo R, Uribe L. *Aedes aegypti*, yellow fever and dengue in the Americas. Mosq. Nnews 1982; 42:497-501.
2. World Health Organization. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Weekly Epidemiol. 1993;43:313-17.
3. Molina de Fernández, Bisset J, Rodríguez M and Soto A. 1997. Identification of resistance mechanisms in *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*) from Venezuela: detoxifying multifunction oxidase. J Am Mosq Control Assoc 13(2):113-26.
4. Bisset LJ, Navarro OA, Marquetti FMC, Mendizabal ME, González BM. Abundancia larval de mosquitos urbanos durante la campaña de erradicación del *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) y dengue en Cuba (1981-1982). Rev Cub Med Trop 1985;37:161-8.
5. Subra R. Biology and control of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: *Culicidae*) with special reference to Africa. Insect Sci appl 1981;1:319-38.
6. Pérez VI. Los Ixódidos y Culícidos de Cuba. Su historia natural y médica. La Habana: Universidad de La Habana, 1956:579.
7. Raymond M. Presentation d' un programme d' analyse log-probit pour microordinateur. Cahiers Orston S'r. Ent M'd. Parasitol 1985;23:117-21.
8. 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.
9. Peiris HTR, Hemingway J. Mechanisms of insecticide resistance in a temephos selected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: *Culicidae*) strain from Sri Lanka. Bull. Ent Res 1990;80:49-55.
10. Bisset LJ, Rodríguez CM, Díaz PC, Ortíz E, Marquetti FMC, Hemingway J. The mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* from Cuba. Bull Entomol Res 1990;80:245-50.
11. Bisset LJ, Rodríguez MM, Dayamí L. Determinación de los mecanismos de resistencia en *Culex quinquefasciatus*, Say 1823 y su aplicación operacional en el uso correcto de insecticidas para el control. Rev Cub Med Trop 1994;46-2.
12. Rodríguez MM, Bisset LJ, Mastrapa L, Díaz PC. 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 Cub Med Trop 1995;47:154-9.
13. Mazarri MB, Georghiou GP. Characterization of resistance to organophosphate carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. J Am Mosq Control Assoc 1995;3:15-22.
14. Rodríguez CM, Bisset LJ, Rodríguez RI, Díaz PC. Determinación de la resistencia a insecticidas y sus mecanismos bioquímicos en dos cepas de *Culex quinquefasciatus* procedentes de Santiago de Cuba. Rev Cubana Med Trop 1997;49(3):209-14.

Recibido: 11 de abril de 1997. Aprobado: 2 de enero de 1998.  
Lic. Juan Bisset. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"  
Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.  
E.mail: ciipk@infomed.sld.cu