

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Evolución de la resistencia a insecticidas en *Culex quinquefasciatus* (Díptera: Culicidae) en un área de La Habana

Dr. Juan A. Bisset,¹ Lic. María M. Rodríguez,² Lic. Cristina Díaz² y Téc. Alaín Soca³

RESUMEN

El uso de malation para el control de mosquitos en Cuba durante 7 años hasta 1986 seleccionó 2 mecanismos de resistencia, el de elevada actividad de esterasas no específicas y la acetilcolinesterasa alterada (Ache) en *Culex quinquefasciatus* (Say). En La Habana, específicamente en el área de estudio (Río Quibú), el malation fue reemplazado por cipermetrina en 1987, y ciclos de tratamiento con cipermetrina han sido usados desde 1987 hasta la fecha en forma de radiobatida cuando se incrementan las poblaciones de *Aedes* o *Culex*. En *Culex quinquefasciatus* (Say) del Río Quibú, los niveles de resistencia declinaron significativamente desde 1986 hasta 1997, sobre todo a malation, no resultó así para los piretroides, donde se observó un incremento de la resistencia durante este período de 11 años. El mecanismo de esterasas elevadas se incrementó a una frecuencia de 1 al igual que hubo un incremento en la frecuencia del mecanismo de Ache. Hasta 1986 se seleccionó en esta población la esterasa B1, responsable de la resistencia a malation, pero no a piretroides. A partir del uso de piretroides para el control en esta área se seleccionaron 2 nuevos fenotipos de esterasas, nombradas A6 y B6, en apariencia relacionadas con la resistencia a piretroides.

Descriptor DeCS: INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS; ESTERASAS; ACETILCOLINESTERASA; RESISTENCIA A INSECTICIDA.

El uso prolongado y sostenido de malation durante la campaña de erradicación del *Aedes aegypti* (Linneaus) en Cuba, favoreció el reemplazo de este mosquito por otro no menos peligroso, *Culex quinquefasciatus*, en zonas urbanas.¹ *Cx. quinquefasciatus* es un importante vector de la filariasis de Bancrofti, y desempeña un papel importante en la transmisión de algunas encefalitis.² Es una de las especies de mosquito mejor adaptada a las más diversas condiciones y modalidades del hábitat humano.³

Los insecticidas organofosforados han sido usados contra especies de *Culex* en muchos países, y el mecanismo basado en la elevada actividad de esterasa ha sido el predominantemente seleccionado. Ambos mecanismos de resistencia, basados en una alta actividad de esterasas y acetilcolinesterasa alterada, han sido seleccionados por la presión de los organofosforados sobre *Culex pipiens* en Francia e Italia y *Cx. quinquefasciatus* de Cuba.^{4,5-8}

¹ Doctor en Ciencias Biológicas. Investigador Auxiliar.

² Licenciada en Bioquímica. Investigadora Agregada.

³ Técnico en Farmacia Industrial.

En Cuba el malation fue usado como larvicida y en forma de rociado espacial por 7 años hasta 1986. El desarrollo de resistencia ha conducido a realizar ciclos alternativos de cipermetrina y malation y cipermetrina sola en el área central de La Habana en 1987.⁵ A principios de 1990 se realizaron bioensayos con permetrina y cipermetrina en poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* en la zona central de La Habana y esto sugirió que la resistencia a piretroides estaba comenzando a desarrollarse.⁷

En este trabajo se siguió la evolución de la resistencia a insecticidas organofosforados y piretroides en *Cx. quinquefasciatus* durante un período de 11 años, se compararon los años 1986 y 1997, y se midieron los cambios en la frecuencia de los mecanismos de resistencia, así como el tipo de esterasa seleccionada en poblaciones bajo diferentes presiones de selección con insecticidas.

MÉTODOS

Cepas

BLEUET: cepa susceptible de referencia, colectada por *Rioux and Pech* y suministrada por *Raymond* en 1986.

QUIBÚ: Una cepa obtenida de la misma área en 1986 y otra colectada en 1997.

Los niveles de resistencia en la cepa QUIBU fueron comparados con la población susceptible BLEUET por los bioensayos en larvas. Las larvas de IV estadio fueron expuestas a insecticidas por el método de la Organización Mundial de la Salud (OMS).⁹ Cada insecticida y las soluciones de acetona fueron adicionadas para dar las concentraciones requeridas para el ensayo.

La acción de 2 sinergistas, SSS tributyl phosphorotrithioate (DEF) y piperonyl butoxide (PB) fueron investigados mediante la exposición de las larvas de cuarto estadio a 0,008 mg/L de DEF o 5 mg/L de PB durante 4 h previo a la adición de la solución del insecticida.¹⁰ No existió mortalidad a estas concentraciones del sinergista solo.

Para los bioensayos se realizaron 5 réplicas (20 larvas por réplica) para 5 dosis, que provocaron una mortalidad entre 2 y 98 %. La concentración final de acetona en las soluciones de prueba fue siempre ajustada a 1 % del volumen final de la

prueba. Esta concentración de acetona no causó mortalidad en los controles. El análisis de regresión de las líneas de los bioensayos se realizó con el programa *probit log*.¹¹

La acetilcolinesterasa insensitiva (Ache) fue ensayada en insectos individuales después que fueron centrifugados los homogenatos a 12 000 g por el método de *Hemingway* y otros.¹² La actividad de Ache en la fracción normal e inhibida fue leída 20 min después de comenzar la reacción a 420 nm. La actividad de las esterasas se determinó individualmente en larvas según el método de *Peiris & Hemingway*.¹³

Se determinó la frecuencia de genes de resistencia para ambos mecanismos, el de esterasas y el de Ache alterada según la fórmula de equilibrio de Hardy-Weinberg.

Electroforesis

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) para la identificación de las esterasas.

- *Buffer* del gel: 0,1 mol tris borato/EDTA *buffer* pH 8,6.
- *Buffer* de corrida: 0,1 mol de tris borato/EDTA pH 8,0.
- No se utilizó gel concentrador, solo un gel de corrida a un porcentaje de 7,5. Se aplicaron 10 uL de muestra + 10 uL del indicador redox bromofenol azul (0,5 % diluido en sacarosa 5 %). La corrida se realizó a 200 V durante 1 h aproximadamente.
- Para la tinción se sumergieron los gels en 50 mL de *buffer* fosfato, conteniendo 4 mL de cada uno de los sustratos inespecíficos de las esterasas (α -naftil acetato y de β -naftil acetato) y se le añadió 0,5 g del colorante *fast-blue* RR. El gel se sumergió en ácido acético 10 % para fijar la coloración de las bandas.

RESULTADOS

Se analizaron los niveles de susceptibilidad o resistencia a insecticidas, organofosforados, piretroides y un carbamato en *Cx. quinquefasciatus* procedente del Río Quibú. Para el cálculo del valor del *factor de resistencia* (FR_{50}), se

utilizaron los valores de CL_{50} de la cepa de *Cx. quinquefasciatus* de referencia BLEUET.

Como se muestra en la figura 1, la resistencia a los insecticidas organofosforados declinó en el período comprendido entre 1986 y 1997, principalmente a malation, declinando de un valor de FR_{50} de 94 x en 1986 a 23,6 x en 1997. La resistencia a malation disminuyó, pero aún se mantienen los genes de la resistencia a este insecticida en las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* del Río Quibú.

En 1986 no se observó resistencia a pirimifos metil (1x), pero declinó aún más su valor hasta 0,2 x. También se observó una disminución de la resistencia al insecticida organofosforado temefos (de 6,0 x a 1,3 x) y al carbamato propoxur (4,4 a 3,14 x).

Un comportamiento diferente se observó en este período con respecto a los piretroides. Como se observa en la figura 2, hubo un incremento de la resistencia a los 3 piretroides evaluados. Se incrementó la resistencia a permetrina de 1,7 x a 10,33 x, a cipermetrina de 1,2 x a 14,4 x y a lambdacialotrina de 5,0 x a 28 x.

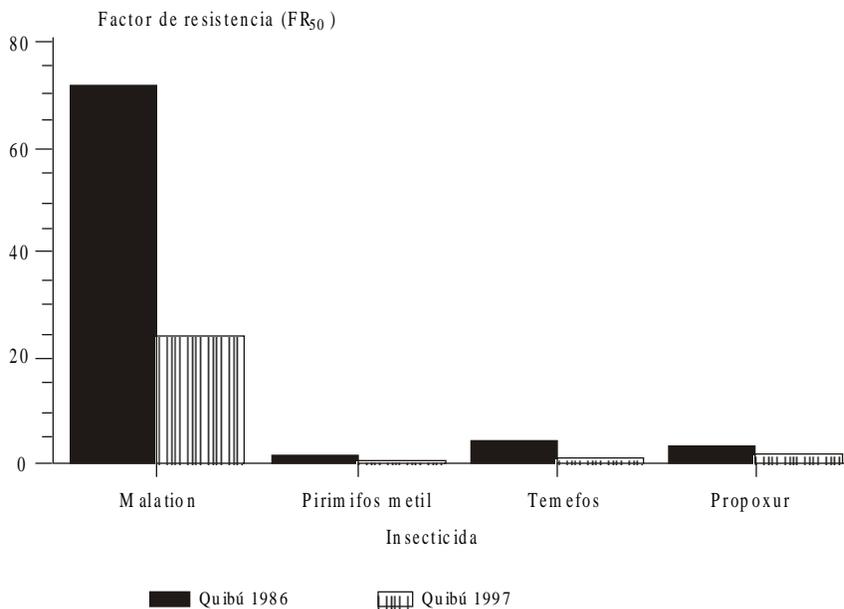


Fig. 1. Variación del factor de resistencia para los insecticidas organofosforados (malation, pirimifos metil y abate) y un carbamato (propoxur), calculados en 1986 y 1999, en *Culex quinquefasciatus*, procedente del Río Quibú.

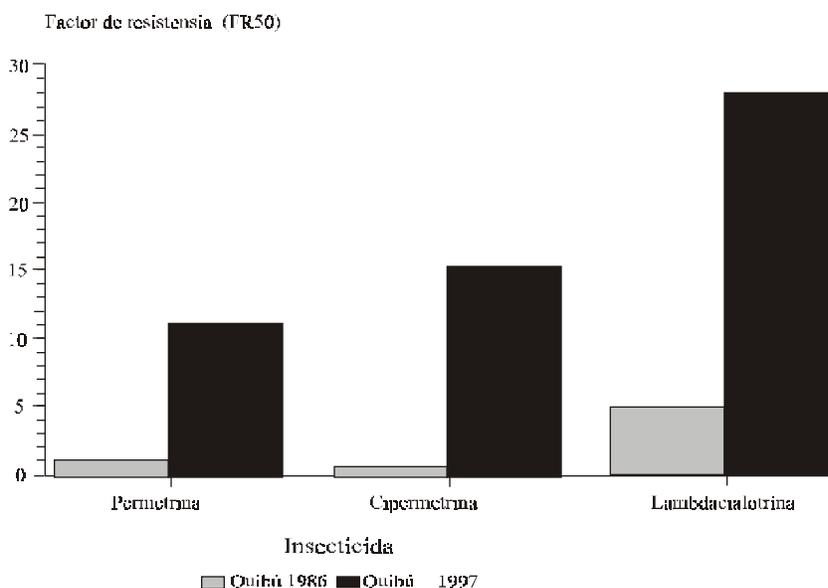


Fig. 2. Variación del factor de resistencia (FR_{50}) para los insecticidas piretroides (permetrina, cipermetrina y lambdacialotrina), calculados en 1986 y 1997 en *Cx. quinquefasciatus* procedente del Río Quibú.

Para determinar *in vivo* el mecanismo de resistencia de las oxidasas de función múltiple, se utilizó el sinergista butóxido de piperonilo (PB) y se calculó el valor del *factor de sinergismo* (FS) para cada insecticida, comparando la CL_{50} obtenida al aplicar el sinergista con la CL_{50} obtenida sin aplicar este.

Como se observa en la tabla 1, el valor del FS resultó menor que 1 para todos los insecticidas organofosforados y carbamatos y mayor que 1 para los insecticidas piretroides, por lo que se infiere que el mecanismo de oxidasas de función múltiple no desempeña una función importante en la resistencia observada en la cepa QUIBU, 1997, a los insecticidas organofosforados malation y temefos, pero sí interviene en la resistencia observada a los piretroides.

TABLA 1. Valor del factor de sinergismo (FS), calculado para 3 insecticidas organofosforados (malation, pirimifos metil y temefos), 3 piretroides (permetrina, cipermetrina y lambdacialotrina), y un carbamato (propoxur) en *Cx. quinquefasciatus* procedente del Río Quibú, 1997, con la utilización del sinergista PB.

Insecticida	CL50 (ppm)	FS	b*
Malation	4,72	0,4	1,81
Pirimifos metil	0,13	0,17	3,0
Temefos	0,019	0,68	4,98
Propoxur	2,19	0,38	2,43
Permetrina	0,056	1,66	4,9
Cipermetrina	0,0029	4,48	1,80
Lambdacialotrina	0,00017	16,47	0,83

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

Se determinó la variación de la frecuencia de los mecanismos de resistencia de esterasas y acetilcolinesterasa entre los años 1986, 1990 y 1997 (tabla 2), con la utilización como cepa de referencia

la cepa BLEUET. Como se muestra en la tabla 2, hubo una declinación entre 1986 y 1990 y un incremento tanto en la frecuencia del mecanismo de esterasas, como del mecanismo de Ache alterada entre 1990 y 1997.

TABLA 2. Cambios en la frecuencia de los mecanismos de resistencia de esterasas inespecíficas y acetilcolinesterasa alterada en el período comprendido entre los años 1986 y 1997, en *Cx. quinquefasciatus* del Río Quibú

Año	Acetilcolinesterasa alterada	Esterasas inespecíficas
1986	0,24 (90)	0,85 (90)
1990	0,14 (90)	0,62 (90)
1997	0,4 (96)	1,0 (96)

Hasta 1986 se seleccionó en la población de *Cx. quinquefasciatus* del Río Quibú una esterasa denominada B1 (fig. 3), sin embargo después que se comenzaron a utilizar piretroides para el control en esta área, aparecieron 2 nuevos tipos de esterasas, clasificadas de acuerdo con su movilidad electroforética y su especificidad por sus sustratos α y β naftil acetato, como esterasas (Est) A6 y B6 (fig. 4).

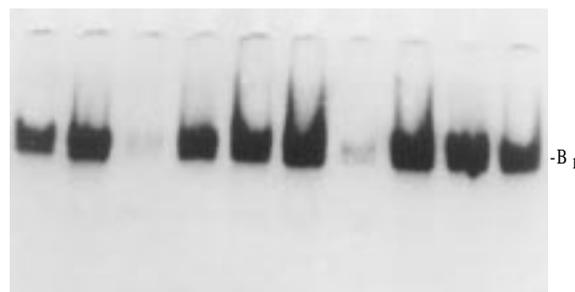


Fig. 3. Patrones de esterasas observadas en una población de *Culex quinquefasciatus* del Río Quibú (esterasa B1), en el año 1986.

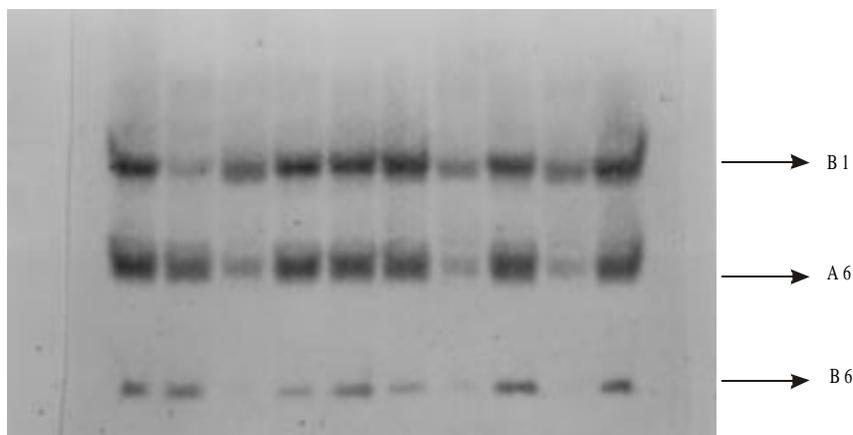


Fig. 4. Patrones de esterasas observadas en una población de *Culex quinquefasciatus* del Río Quibú (esterasas B1-A6-B6), en el año 1997.

DISCUSIÓN

En 1986 hubo un incremento de las densidades de *Cx. quinquefasciatus* en áreas urbanas de Cuba a pesar del tratamiento de estas poblaciones con insecticidas, y se demostró la presencia de resistencia a malation en 2 poblaciones de campo de *Cx. quinquefasciatus*, colectadas del campo en Provincia Habana, donde se observó resistencia cruzada a temefos y propoxur, este último no utilizado para el control de mosquitos en Cuba.⁵ Se demostró además que la resistencia estaba dada por la presencia de 2 mecanismos de resistencia, el de elevada actividad de esterasas inespecíficas y la acetilcolinesterasa alterada (Ache).

En 1986 el malation fue reemplazado por piretroides para el control de *Cx. quinquefasciatus* en Cuba y en 1990 se observó en 5 poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* de Ciudad de La Habana la presencia de ambos mecanismos de resistencia; aunque hubo una declinación en su frecuencia comparada con el año 1986.⁷ En 1997 la frecuencia de esterasas elevadas se incrementó aún más a un valor de 1, lo que puede estar asociado con los nuevos fenotipos presentes (Est A6 y B6), además del fenotipo de Est B1 que se reportó en 1986.

La correlación entre la actividad de esterasas y la resistencia a los compuestos organofosforados está bien documentada^{5,7,14-16} Han sido reconocidas 8 esterasas en *Culex* como responsables de la resistencia a insecticidas organofosforados, basado en su movilidad electroforética y en su preferencia por hidrolizar α o β naftil acetato.^{17,18} Se demostró que los altos niveles de resistencia conferidos por las esterasas B, en cepas resistentes a organofosforados, estaban relacionados con una superproducción de la enzima, como resultado de la amplificación genética.¹⁹

A pesar de los trabajos de Abernathy y Casida²⁰ y Joao y Casida,²¹ donde se demostró una pobre asociación entre la resistencia a los piretroides y el mecanismo de las esterasas, los altos valores de sinergismo observados al aplicar DEF en este trabajo y de acuerdo con otros resultados obtenidos en cepas de Provincia Habana,²² más la poca afectación que tuvieron los piretroides cuando solo se había seleccionado en Cuba en 1986 el gen de la esterasa B1 para la resistencia,⁷ evidencian la aparición de

un nuevo mecanismo en *Cx. quinquefasciatus*, asociado con la resistencia a piretroides.

La esterasa B1 observada en *Cx. quinquefasciatus* de Cuba no genera resistencia cruzada a piretroides,⁷ pero aparentemente son los nuevos fenotipos de esterasas A6 y B6, por sí solos o asociados con la esterasa B1, los que generan resistencia cruzada a los piretroides.

Los datos de este trabajo indican que la resistencia a piretroides en el Quibú, La Habana, no es todavía un problema serio. Por lo tanto a través de un cuidadoso uso regulado, la vida útil de los piretroides en Cuba podría prolongarse indefinidamente. La presencia de la alta frecuencia de 2 mecanismos de resistencia a organofosforados, 11 años después de detener el uso de los tratamientos con malation, significa que no es fácil revertir a las aplicaciones con malation para eliminar la resistencia a los piretroides. Sin embargo pirimifos metil es relativamente no afectado por los mecanismos de resistencia a malation, aun cuando los factores de resistencia han sido seleccionados cerca de su fijación. Teniendo en cuenta que pirimifos metil es también completamente efectivo contra la resistencia a piretroides en *Cx. quinquefasciatus* de Cuba, este insecticida podría ser apropiado para su uso en un esquema rotacional de control de la resistencia.

SUMMARY

The use of malathion to control mosquitoes in Cuba during 7 years until 1986 selected 2 resistance mechanisms: that of elevated activity of nonspecific esterases and that of altered acetylcholinesterase (Ache) in *Culex quinquefasciatus* (Say). In Havana, specifically in the area under study (Quibú River), malathion was replaced by cypermethrin in 1987 and cycles of treatment with cypermethrin have been intensively used since 1987 up to now when the populations of *Aedes* or *Culex* increase. In *Culex quinquefasciatus* (Say) from the Quibú River the resistance levels, mainly to malathion, declined significantly from 1986 to 1997. An increase of resistance to pyrethroid was observed during that period of 11 years. The mechanism of elevated esterases rose to a frequency of 1 and there was also an increase in the frequency of the mechanism of Ache. The esterase B1, responsible for the resistance to malathion, but not to pyrethroid, was selected in this population until 1986. Starting from the use of pyrethroid for the control in this area, 2 new phenotypes of esterases named A6 and B6, apparently related to pyrethroid resistance, were selected.

Subject headings: INSECTICIDES, ORGANOPHOSPHATE; ESTERASES, ACETYLCHOLINESTERASE; INSECTICIDE RESISTANCE.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bisset JA, Navarro A, Marquetti MC, Mendizabal ME, González BM. La abundancia larval de mosquito urbano durante la campaña de erradicación de *Aedes aegypti* y del dengue en Cuba. Rev Cubana Med Trop 1985;37:161-8.
2. Subra R. Biology and control of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) with special reference to Africa. Ins Scien Appl 1981;1:319-38.
3. Pérez-Vigueras I. Los ixódidos y culicidos de Cuba. Su historia natural y médica. La Habana: 1956;363-6.
4. Raymond M, Fournier D, Bridge JM, Cuany A, Berge J, Magning M, et al. Identification of resistance mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from southern France: Insensitive acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. J Econ Entomol 1986;79:1452-8.
5. Bisset JA, Rodríguez MM, Díaz C, Ortiz E. The mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Cx. quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Cuba. Bull Entomol Res 1990;80:245-50.
6. Rodríguez MM, Ortíz E, Bisset JA, Hemingway J, Salcedo E. Changes in malathion and pyrethroid resistance after cypermethrin selection of field populations of *Cx. quinquefasciatus* from Cuba. Med Vet Entomol 1993;7:117-21.
7. Bisset JA, Rodríguez MM, Hemingway J, Díaz C, Small GJ, Ortiz E. Malathion and pyrethroid resistance in *Cx. quinquefasciatus* from Cuba: efficacy of pirimiphos methyl in the presence of at least three resistance mechanisms. Med Vet Entomol 1991;5:223-8.
8. Bonning BC, Hemingway J, Romi R, Majori G. Interaction of insecticide resistance genes in field populations of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Italy in response to changing insecticide selection pressure. Bull Entomol Res 1991;81:5-10.
9. World Health Organization. Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitos to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides diagnostic test, 1981;WHO/VBC/81,806.
10. Ranasinghe LE, Georghiou GP. Comparative modification of insecticide resistance spectrum of *Culex pipiens fatigans* wied by selection with temephos and temephos/synergist combinations. Pest Sci 1979;10:502-8.
11. Raymond M. Present d' un programme d' analyse log-probit pour microordinateur Cahers Orstrome Sér. Ent Med Parasitol 1985;23:117-21.
12. Hemingway J, Smith C, Jayawardena KGI, Heath PRJ. Field and laboratory detection of the altered AchE resistance genes which confer organophosphate and carbamate resistance in mosquitoes (Diptera: Culicidae) Bull Ent Res 1986;76:359-66.
13. Peiris HTR, Hemingway J. Characterization and inheritance of elevated esterases in organophosphorus and carbamate insecticide resistance *Cx. quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Sri Lanka. Bull Ent Res 1990;83:127-32.
14. Georghiou GP, Pasteur N, Hawley MK. Linkage relationships between organophosphate resistance and a highly active esterase B in *Culex pipiens quinquefasciatus* Say from California. J Econ Entomol 1980;73:301-5.
15. Poirie M, Raymond M, Pasteur N. Identification of two distinct amplifications of the esterase B locus in *Culex pipiens* (L.) mosquitoes from Mediterranean countries. Biochem Genet 1992;30:13-26.
16. Bourguet D, Pasteur N, Bisset JA, Raymond M. Determination of Ace 1 genotypes in single mosquitoes: toward an ecumenical and biochemical test. Pestic Biochem Physiol 1996;55:1-7.
17. Georghiou GP, Pasteur N. Electrophoretic esterase patterns in insecticide resistant and susceptible mosquitoes. J Econ Entomol 1978;71:201-5.
18. Curtis CF, Pasteur N. Organophosphate resistance in vector populations of the complex *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). Bull Entomol Res 1981;71:153-61.
19. Raymond M, Beyssart-Arnaouty V, Sivasubramanian N, Mouches C, Georghiou GP, Pasteur N. Amplification of various esterases B's responsible for organophosphate resistance in *Culex* mosquitoes. Biochem Genet 1989;27:417-23.
20. Abernathy CO, Casida JE. Pyrethroid Insecticides: Esterase cleavage and relationship to selective toxicity. Science 1979;123:5-6.
21. Joao LT, Casida JE. Insect pyrethroid hydrolyzing esterase. Pest Biochem Physiol 1974;4:465-72.
22. Rodríguez MM, Bisset JA, Mastrapa L, Díaz C. Asociación de la resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides, con los mecanismos de resistencia observados en cepas de *Cx. quinquefasciatus* de Ciudad de La Habana. Rev Cubana Med Trop 1995;47:154-60.

Recibido: 3 de febrero del 2000. Aprobado: 7 de junio del 2000.
 Dr. Juan A. Bisset. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: ciipk@ipk.sld.cu