

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Estudio de resistencia de *Aedes aegypti* a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Dr. René Gato Armas,¹ Téc. Manuel Díaz Pérez,² Téc. Rosa Bruzón Águila,³ Lic. Zulema Menéndez Díaz,⁴ Lic. Aileen González Rizo,⁵ Lic. Yenín Hernández González⁶ y Dr. Israel García Ávila⁷

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: el uso prolongado de insecticidas ha conducido al desarrollo de resistencia en diferentes especies de mosquitos incluido el *Aedes aegypti*, aunque hasta el momento no existen reportes de resistencia a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **OBJETIVO:** evaluar la resistencia a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en poblaciones de *Aedes aegypti* provenientes de sitios donde se ha aplicado la formulación líquida Bactivec (Labiofam) y en cepas de laboratorio bajo presión de selección. **MÉTODOS:** se realizaron colectas de larvas en 3 municipios de Ciudad de La Habana y se establecieron las colonias de *Aedes aegypti* en el laboratorio, las cuales se compararon en susceptibilidad a *Bacillus thuringiensis* con la cepa de referencia Rockefeller. El experimento de selección se realizó exponiendo generaciones sucesivas de una cepa susceptible a la dosis letal 90 del biolarvicida. **RESULTADOS:** el índice de resistencia 50 para las cepas de los municipios Plaza, Cerro y Boyeros fue de 1,07, 0,66 y 0,81, respectivamente, por lo cual pueden considerarse susceptibles. La cepa expuesta a intensa presión de selección con el biolarvicida mostró índices de resistencia 50 y 95 de 2,7 y 4,6, respectivamente. La menor pendiente de la línea de regresión correspondió a la cepa bajo selección, lo que indica mayor variabilidad genética de esta población. **CONCLUSIONES:** estos resultados justifican la utilización de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* como una alternativa para el control de estadios inmaduros de *Aedes aegypti* sin que exista evidencia hasta el presente de aparición de resistencia en poblaciones de campo, pero deben trazarse estrategias de manejo adecuadas ante la potencialidad del vector de adquirirla.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, *Aedes aegypti*, resistencia, control biológico.

INTRODUCCIÓN

La incidencia del dengue ha aumentado exponencialmente en los últimos 35 años a escala mundial. Se estima que no se podrá contar con una vacuna contra la enfermedad en los próximos 5 a 10 años, por lo que en la actualidad, la reducción del vector continúa siendo la única alternativa viable para el control.¹ Sin embargo, el uso prolongado

de insecticidas químicos contra *Aedes aegypti* ha conducido al desarrollo de resistencia.² Por otra parte, los plaguicidas producen afectaciones a las poblaciones de otros insectos, los animales y al hombre, y las nuevas formulaciones químicas desarrolladas suelen ser costosas. Alternativas, como el control biológico, son cada vez más necesarias.³

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* sintetiza las proteínas Cry IVA, Cry IVB, Cry 11A

¹ Doctor en Medicina. Máster en Bacteriología Micología. Especialista en Microbiología. Instructor. Departamento de Control de Vectores. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). La Habana, Cuba.

² Técnico en Investigación Científica. IPK.

³ Técnico en Procesos Biológicos. IPK.

⁴ Licenciada en Ciencias Biológicas. Investigadora Auxiliar. IPK.

⁵ Máster en Bacteriología Micología. Licenciada en Microbiología. Investigadora Agregada. IPK.

⁶ Licenciada en Ciencias Biológicas. Investigadora Agregada. IPK.

⁷ Doctor en Ciencias Biológicas. Investigador y Profesor Titular. IPK.

y Cyt 1A que resultan tóxicas individualmente para varios géneros de mosquitos, pero se ha demostrado además marcado sinergismo.^{4,5} Sin embargo, aun con estos y otros factores de virulencia que posee, se ha logrado establecer resistencia por selección en el laboratorio, aunque hasta la fecha no hay reportes de desarrollo natural en campo para este serotipo en particular. Si bien los estudios de laboratorio no necesariamente predicen el desarrollo de resistencia en el campo, constituyen una alerta de los potenciales mecanismos disponibles en las poblaciones de insectos.⁶

En Cuba se ha utilizado ampliamente la formulación líquida Bactivec (Labiofam), sobre la base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* para el control de diferentes géneros de culícidos, pero no hay reportes de estudios de resistencia. Se propuso evaluar la susceptibilidad de poblaciones de *Aedes aegypti* de sitios donde se ha aplicado el producto, y por otro lado realizar un experimento de selección al nivel de laboratorio, exponiendo una cepa sensible de referencia a concentraciones subletales de Bactivec.

MÉTODOS

Biolarvicida: Bactivec (Labiofam, Cuba). Formulación líquida de 600 UTI, título $1,2 \times 10^9$ UFC/L. Las diluciones del producto para los bioensayos y demás experimentos fueron establecidas en porcentaje en relación volumen/volumen.

Mosquitos: Cepa susceptible de referencia: Rockefeller, mantenida en laboratorio sin exposición a plaguicidas. Cepas de campo: se colectaron larvas y pupas de *Aedes aegypti* en 3 municipios de Ciudad de La Habana en 2006, durante la campaña intensiva de control del vector, todos los individuos de cada zona provinieron de un mismo tipo de criadero que, en los 3 casos, se trató de tanques destinados a almacenar agua para consumo humano. En el laboratorio se les propició la reproducción y se establecieron las colonias manteniendo temperatura de 27 ± 1 °C, humedad relativa de 80 ± 10 % y ciclo luz/oscuridad de 12 h.

Bioensayos para evaluar la susceptibilidad: se siguieron los lineamientos de la OMS para

larvicidas bacterianos de uso en salud pública.⁷ Se realizaron de manera simultánea con las 4 cepas de mosquitos y se repitieron 3 veces en semanas diferentes.

El índice de resistencia (IR) se calculó dividiendo la concentración letal (CL) 50 o 95 de una cepa determinada, entre la correspondiente de la cepa de referencia.

Experimento de selección de laboratorio: se realizó por exposición en cada generación del mosquito a la CL₉₀ del Bactivec. Partiendo de la cepa de referencia, se expusieron cada vez 1 000 larvas de tercer estadio tardío, a las 4 h se cambió el agua y se fueron retirando las larvas muertas cada 6 h. De los sobrevivientes se escogieron 20 pupas hembras y 10 machos que se colocaron en jaulas para comenzar una nueva generación.

Después de 12 exposiciones se calculó la CL₅₀ de la cepa parental (de referencia) para compararla con la cepa expuesta al Bactivec, denominada: Bajo presión.

Los resultados de los bioensayos, con transformación logarítmica base 10 de las dosis, fueron sometidos a un análisis de regresión Probit utilizando el programa de computación NCSS. La calidad de los datos fue analizada según los valores de heterogeneidad, y se obtuvo la gráfica de regresión dosis/respuesta, con los intervalos de confianza (IC) y el valor de la pendiente. La comparación entre los grupos se realizó mediante un análisis de la varianza de un factor, estableciendo un valor de significación de 0,05. Para analizar los resultados del experimento de selección en el laboratorio se aplicó una t de Student.

RESULTADOS

Los valores de CL₅₀ y CL₉₅ de las cepas colectadas en Ciudad de La Habana no mostraron diferencias significativas respecto a la cepa de referencia, con solapamiento de los IC, incluso la CL₉₅ para las 3 cepas provenientes del campo fue algo menor que para la cepa Rockefeller. Obviamente los IR 50 y 95 fueron muy bajos para todas las cepas (tabla 1), lo cual sugiere que no se ha desarrollado ningún mecanismo de resistencia.

TABLA 1. Concentraciones letales 50 y 95 de *Bacillus thuringiensis*, con sus respectivos índices de resistencia y relación CL_{95}/CL_{50} , para las cepas de *Aedes aegypti* salvajes y de referencia

Cepa	CL_{50}	CL_{95}	IR 50	IR 95	CL_{95}/CL_{50}
Rockefeller	0,00049 %	0,00134 %	-	-	2,7
Plaza	0,00052 %	0,00128 %	1,06	0,96	2,4
Cerro	0,00032 %	0,00060 %	0,65	0,45	1,8
Boyeros	0,00040 %	0,00072 %	0,82	0,54	1,8

TABLA 2. Concentraciones letales 50 y 95 de *Bacillus thuringiensis*, índice de resistencia y pendiente de la línea de regresión, para las cepas de *Aedes aegypti* "Referencia" y "Bajo presión", en el experimento de selección al nivel de laboratorio

Cepa	CL_{50}	IR 50	CL_{95}	IR 95	Pendiente
Referencia	0,0007 %	-	0,0013 %	-	5,6
Bajo presión	0,0019 %	2,7	0,0061 %	4,6	4,3

Sin embargo, al nivel de laboratorio, la propia cepa Rockefeller bajo intensa presión con el biolarvicida, mostró índices de resistencia 50 y 95 de 2,7 y 4,6, respectivamente; lo que si bien la clasifica como sensible según los criterios aceptados, evidencia una disminución que es significativa estadísticamente ($p < 0,05$), respecto a la cepa parental (tabla 2). Nótese que el valor de la pendiente fue inferior en la cepa bajo presión de selección.

DISCUSIÓN

Hasta la fecha, la aplicación de *Bacillus thuringiensis* en Cuba para el control de *Aedes aegypti* no ha sido realizada de forma continua ni durante períodos prolongados, de manera que las cepas de mosquito evaluadas, si bien proceden de zonas donde se ha aplicado, no han sufrido gran presión. Ello explica que los valores de CL sean, en varios casos, incluso ligeramente inferiores a la cepa de referencia. Goldman y otros, tampoco encontraron disminución de la susceptibilidad en estudios de campo, aun con aparente mayor exposición que la supuesta para nuestras cepas.⁸

El desarrollo de resistencia en el laboratorio por selección ha sido conseguido relativamente en corto tiempo para *Bacillus sphaericus*, que también además ha mostrado disminución de su efectividad sobre poblaciones de campo.⁹ Sin embargo, *Bacillus thuringiensis*, al parecer por el complejo

de toxinas con acción sinérgica que elabora, no ha sido implicado en fenómenos de resistencia en campo y no evolucionó en *Aedes aegypti* a más de 3 o 4 veces respecto a la cepa parental, cuando se expuso en el laboratorio de forma continuada.⁸

En el presente experimento la presión de selección ejercida en laboratorio fue intensa en el tiempo, dosis y número de individuos con que se inició cada nueva generación. La dosis fue aplicada en cada generación de mosquito, capaz de producir más de 90 % de mortalidad y como resultado la siguiente generación partió de solo 0,03 % de los individuos expuestos, aproximadamente.

A pesar de que se observó escasa disminución de la susceptibilidad, los resultados sugieren que *Aedes aegypti* es capaz de desarrollar mecanismos de resistencia, aun contra los complejos factores de virulencia de *Bacillus thuringiensis*.

La disminución en la pendiente de la línea de regresión podría deberse a un incremento en la variabilidad de la población de insectos, como consecuencia del desarrollo en una parte de ellos de mecanismos para resistir o tolerar mejor el biolarvicida. Esto, sin embargo, podría cambiar con sucesivas exposiciones, al ir depurándose la población hacia los más competentes. Similar comportamiento se observó para exposición a una o varias toxinas de *Bacillus thuringiensis* en *Culex quinquefasciatus*.¹⁰ Se requieren estudios de cruzamiento para determinar el tipo de herencia del carácter resistencia que pudiera explicar estos resultados.

Contrariamente, *Mulla* y otros observaron hacia la décima generación incremento en la pendiente, atribuyendo tal comportamiento a la disminución en la variabilidad genética por selección, pero en este caso se trató de *Bacillus sphaericus*, cuyo mecanismo de acción difiere de *Bacillus thuringiensis* y la resistencia se ha establecido con mayor facilidad.¹¹

Se hace evidente la necesidad de un manejo adecuado, como la optimización de la dosis de aplicación en campo, en orden de evitar subexposición. Aun así, la disminución de la acción de este tipo de biolarvicida suele ser gradual,¹² esto implica que inevitablemente en algún momento habrá criaderos con dosis subletales. Otras estrategias como la rotación y la mezcla con otros agentes han sido propuestas.¹³ Aunque *Bacillus sphaericus* no ha mostrado efectividad por sí solo contra *Aedes aegypti*, su potenciación con la toxina Cyt1A de *Bacillus thuringiensis* incrementa significativamente su eficacia.⁵ Por otra parte, la mezcla de ambas bacterias o algunas de sus toxinas en particular retarda la emergencia de resistencia.^{14,15}

Estos resultados indican que hasta el momento no existen evidencias de disminución de la susceptibilidad a *Bacillus thuringiensis israelensis* en poblaciones naturales de *Aedes aegypti* en los municipios muestreados, por lo que puede constituir una alternativa para el control del vector, pero debe seguirse una estrategia adecuada ante la potencialidad de desarrollo de resistencia.

Study of *Aedes aegypti* resistance to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

ABSTRACT

INTRODUCTION: Prolonged use of insecticides has led to resistance development in different mosquito species including *Aedes aegypti*, although there is no report of resistance to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* so far. **OBJECTIVE:** To evaluate resistance to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in *Aedes aegypti* populations from places where fluid preparation Bactivec (made in Labiofam company) has been applied, and in lab strains under selection. **METHODS:** Larvae were collected in three municipalities of the City of Havana province to settle *Aedes aegypti* colonies in the laboratory, which were compared with reference strain called Rockefeller in terms of susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. The selection experiment was performed by exposing successive generations of a strain susceptible to lethal dose 90 of this biolarvicide. **RESULTS:** Resistance index 50 for strains from Plaza, Cerro and Boyeros was 1,07, 0,66 and 0,81 respectively, so they may be considered as susceptible strains. The strain exposed to intensive selection pressure with the biolarvicide showed resistance indexes 50 and 95 equal to 2,7 and 4,6 respectively. The smallest regression line slope was found in the selection strain, which indicated a greater genetic variability

in this population. **CONCLUSIONS:** these results support the use of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as an alternative for management of immature *Aedes aegypti* without any evidence whatsoever of emerging resistance in the field population, but some adequate management strategies should be drawn, taking into account the vector's potentialities to acquire it.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Aedes aegypti*, resistance, biological control.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Guzmán MG, García G, Kourí G. El dengue y el dengue hemorrágico: prioridades de investigación. Pan Am J Public Health. 2006;19(3):204-15.
- Rawlins SC. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. Pan Am J Public Health. 1998;4(4):243-51.
- Federici BA, Park HW, Bideshi DK, Wirth MC, Johnson JJ, Sakano Y, et al. Developing recombinant bacteria for control of mosquito larvae. J Am Mosq Control Assoc. 2007;23 (2 Suppl):164-75.
- Whalon ME, Wingerd BA. Bt: Mode of Action and Use. Arch Insect Biochem Physiol. 2003;54:200-11.
- Wirth M, Jiannino JA, Federici BA, Walton WE. Synergy between Toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus*. J Med Entomol. 2004;41(5):935-41.
- Ferré J, Van Rie J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Ann Rev Entomol. 2002;47:501-33.
- World Health Organization. Guideline specifications for bacterial larvicides for public health use. Geneva: WHO; 1999. (WHO/CDS/CPC/WHOPE/99.2)
- Goldman IF, Arnold J, Carlton BC. Selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in field and laboratory populations of the mosquito *Aedes aegypti*. J Invertebr Pathol. 1986;47:317-24.
- Wirth MC, Georgiopoulos GP, Malik JJ, Abro GH. Laboratory selection for resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from California, USA. J Med Entomol. 2000;37:534-40.
- Georgiopoulos GP, Wirth MC. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. Appl Environ Microbiol. 1997;63(3):1095-101.
- Rodcharoen J, Mulla MS. Resistance development in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus*. J Econ Entomol; 1994;87(5):1133-40.
- Soares RJ, Ferreira AC, Wellington J, Sansígolo LR. Residual effect of commercial applications of larvicides Temephos and *Bacillus thuringiensis israelensis* on *Aedes aegypti* larvae in recipients with water renewal. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38(4):316-21.
- Zahiri NS, Su T, Mulla MS. Strategies for the management of resistance in mosquitoes to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. J Med Entomol. 2002;39(3):513-20.
- Mulla MS, Thavara U, Tawatsin A, Chomposri J, Su T. Emergence of resistance and resistance management in field population of tropical *Culex quinquefasciatus* to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. J Am Mosq Control Assoc. 2003;19(1):39-46.
- Wirth MC, Jiannino JA, Federici BA, Walton WE. Evolution of resistance toward *Bacillus sphaericus* or a mixture of *B. sphaericus* + Cyt 1A from *Bacillus thuringiensis*, in the mosquito, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). J Invertebr Pathol. 2005;88:154-62.

Recibido: 12 de octubre de 2007. Aprobado: 23 de noviembre de 2007. Dr. René Gato Armas. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía Km 6. AP 601, Marianao 13. Ciudad Habana, Cuba. Teléf.: (53 7) 2020650 Correo electrónico: rene@ipk.sld.cu