

Selección de una cepa susceptible a insecticidas de *Aedes albopictus* como referencia para estudios de resistencia en esta especie

Selection of a strain sensitive to insecticides of *Aedes albopictus* as a reference to resistance studies in this species

Juan A. Bisset, María M. Rodríguez, Luis Piedra, Ilario Fuentes, Yanisley Martínez, Gladys Gutiérrez, Natividad Hernández, Israel García García

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: *Aedes albopictus* es un mosquito que representa una amenaza para la salud pública por constituir un vector potencial de dengue, zika y chikungunya. El control químico es aún el más efectivo para controlar la transmisión de arbovirus. En Cuba no se han realizado estudios sobre resistencia a insecticidas en esta especie y para ello se necesita disponer de una cepa de referencia susceptible.

Objetivo: Seleccionar una cepa susceptible a insecticidas de *Ae. albopictus* como referencia para estudios de resistencia en esta especie.

Métodos: Se utilizaron tres cepas de *Ae. albopictus*, colectadas en Ciudad de La Habana: 1) Fraga del municipio La Lisa, 2) Zoológico del municipio Plaza de la Revolución, y 3) Boyeros del municipio Boyeros. Se evaluó el nivel de susceptibilidad a insecticidas a través de bioensayos de la Organización Mundial de la Salud y el método de las botellas impregnadas, recomendado por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades.

Resultados: De las tres cepas evaluadas, Fraga mostró los valores más bajos de concentraciones letales para el insecticida organofosforado temefos en larvas, se demostró el desarrollo de resistencia en la cepa Zoológico y Boyeros resultó susceptible. En el estado adulto la cepa Fraga resultó susceptible a los piretroides cipermetrina, lambdacialotrina y deltametrina, al organofosforado clorpirifos y a los carbamatos propoxur y bendiocarb. En verificación para la resistencia a lambdacialotrina y deltametrina resultó Zoológico y para deltametrina la cepa Boyeros.

Conclusiones: La cepa Fraga mostró susceptibilidad a todos los insecticidas evaluados, y fue utilizada como referente en este estudio y será mantenida en el laboratorio con

este fin para profundizar en los estudios de resistencia a insecticidas en esta especie y nombrada ahora FragaAlbS-CU.

Palabras clave: *Aedes albopictus*; resistencia a insecticidas; cepa de referencia susceptible.

ABSTRACT

Introduction: *Aedes albopictus* is a mosquito that represents a threat to public health constituting a potential vector of dengue, zika and chikungunya. Chemical control is still the most effective method to avoid the transmission of this arbovirus. In Cuba, any study has been made on resistance to insecticides in this species, and it is necessary to have a referred sensitive strain.

Objective: To select a strain sensitive to insecticides of *Ae.albopictus* as a reference to resistance studies in this species.

Methods: Three strains of *Ae.albopictus* collected in Havana City were used: 1) Fraga of La Lisa municipality, 2) Zoo of Plaza de la Revolución municipality, and 3) Boyeros of Boyeros municipality. It was evaluated the level of sensitiveness to insecticides through bio-essays of the World Health Organization and the method of impregnated bottles recommended by the Center for the Control and Prevention of Diseases.

Results: Of the three evaluated strains, Fraga sample showed the lowest levels of lethal concentrations for the organophosphate temephos´ insecticide in larvae. It was demonstrated the development of resistance in Zoo strain, and Boyeros strain resulted sensitive. In the adult stage, Fraga strain resulted sensitive to the pyrethroids: cipermetrine, lambdacialotrine and deltametrine, also to the organophosphate called chlorpyrifos; and to the carbamates called propoxur and bendiocarb. While verifying the resistance to lambdacialotrine and deltametrine, Zoo strain´s sample resulted positive, and Boyeros sample was positive to deltametrine.

Conclusions: Fraga strain showed sensitiveness to all the evaluated insecticides, and it was used as a reference in this study. It will be kept in the laboratory with the aim to deepen in the studies on resistance to insecticides in this species that is currently named FragaAlbS-CU.

Keywords: *Aedes albopictus*; resistance to insecticides; referred sensitive strain.

INTRODUCCIÓN

Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse, 1895), conocido como mosquito tigre asiático, es una especie nativa del Este Asiático. Es un vector competente de al menos 26 arbovirosis, incluyendo los virus dengue (DENV), chikungunya (CHIKV), y zika (ZIKV).¹⁻⁴

El diagnóstico de resistencia a insecticidas en *Aedes* spp., se realiza a través de bioensayos biológicos recomendados por la Organización Mundial de la Salud^{5,6} y a través de ensayos bioquímicos⁷ o moleculares,^{8,9} y algunos autores realizan algunas modificaciones de los métodos para un mejor diagnóstico de la resistencia en una especie específica. El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de

Atlanta estableció las dosis diagnósticas para el uso de las botellas impregnadas para el diagnóstico en *Aedes* spp. y *Anopheles* sp.¹⁰ Pero de acuerdo con el criterio de la Organización Mundial de la salud,¹¹ la resistencia es un fenómeno que varía en el tiempo y en el espacio, y dentro de la misma especie. De aquí que las investigaciones que se realizan en las diferentes especies de mosquitos vectores de enfermedades, necesitan disponer de cepas de referencia susceptibles a insecticidas, especie específica para poder establecer criterios de diagnósticos más precisos, aunque se utilicen los mismos ensayos biológicos y métodos para estudios de mecanismos de resistencia a nivel bioquímico y molecular.

En los últimos años ya se ha diagnosticado resistencia a insecticidas en *Ae. albopictus*, así como los mecanismos bioquímicos y moleculares responsables de esta y para ello han caracterizado cepas de *Ae. albopictus* susceptibles a insecticidas, que han sido utilizadas como referentes en estas investigaciones, como es la cepa ATM95,¹² de Estados Unidos; la cepa Par-GR;¹³ procedente de Grecia; y la cepa Lab, de referencia susceptible colectada en Malasia.¹⁴ Con el propósito de conocer sobre el desarrollo de resistencia a insecticidas en *Ae. albopictus* de Cuba, así como de disponer de una cepa de *Ae. albopictus* susceptible a insecticidas para ser utilizada como referente en estudios bioquímicos y moleculares, el objetivo del presente trabajo fue seleccionar una cepa susceptible a insecticidas de *Ae. albopictus* como referencia para estudios de resistencia en esta especie.

MÉTODOS

Cepas de *Ae. albopictus*

Fraga: cepa de *Ae. albopictus*, colectada del Reparto Residencial Juan de Dios Fraga en el año 2012, ubicado en el municipio La Lisa, La Habana.

Zoológico: cepa de *Ae. albopictus*, colectada en el Jardín Zoológico de La Habana en el año 2017, ubicado en el municipio Plaza de la Revolución, La Habana.

Boyeros: cepa de *Ae. albopictus*, colectada del área de salud de Boyeros en el año 2017, ubicado en el municipio Boyeros, La Habana.

Insecticidas utilizados para el trabajo

Insecticidas formulación técnica

Larvicida:

- Temefos: 93,3 % de pureza, suministrado por American Cyanamid Co, Princeton, NJ.

Adulticidas:

- Deltametrina: 96,8 % de pureza, suministrado por Roussel Uclaf (Romainville, Francia).
- Cipermetrina: 98 % de pureza, suministrado por Chemotécnica SA, Argentina.
- Lambdacialotrina: 97,8 % de pureza, suministrado por Syngenta, SA.

- Clorpirifos: 98 % de pureza, suministrado por Chemotécnica SA, Argentina.
- Propoxur: 98 % de pureza, suministrado por Bayer SA, Alemania.
- Bendiocarb: 98 % de pureza, suministrado por Bayer SA, Alemania.

Bioensayos de susceptibilidad en larvas. Se evaluó la susceptibilidad insecticida organofosforado temefos, a través de los bioensayos de susceptibilidad de la Organización Mundial de la Salud,⁵ en larvas tercer estadio tardío o cuarto temprano de ROCKEFELLER y AlboS-CU para determinar la concentración que causa el 50 % y 90 % de letalidad (CL_{50} y CL_{90}). Se aplicaron cinco o más concentraciones del insecticida con acetona como diluyente y se evaluaron cinco réplicas y un control por cada concentración, las que causaron una letalidad entre 2 % y 98 %. Se evaluaron un total de 300 larvas por cada concentración del insecticida. El control consistió en añadir 1 mL de acetona. La letalidad se determinó 24 h después de aplicado el insecticida. Los resultados se analizaron mediante la prueba probit implementada en el programa estadístico SPSS versión 11.5, el cual permite contrastar gráficamente la letalidad observada contra el logaritmo de las dosis del insecticida a evaluar. Se calculó el factor de resistencia (FR_{50} y FR_{90}) a partir de los valores de CL_{50} y CL_{90} . Se utilizó como criterio de diagnóstico: FR_{50} o $FR_{90} < 5$ susceptible, entre 5 y 10 moderada resistencia, y > 10 alta resistencia.¹⁵

Bioensayos de susceptibilidad en mosquitos adultos. Los bioensayos para evaluar el nivel de resistencia a insecticidas en el estado adulto fueron realizados utilizando la metodología, previamente descrita por Brogdon y McAllister, en 1998,¹⁶ estandarizadas por el CDC en el 2010.¹⁰ En cada experimento se utilizaron cuatro réplicas y un control. El control consistió en utilizar una botella impregnada con acetona. En cada botella se colocaron entre 16 y 20 mosquitos de 3 días de nacidos. La letalidad se leyó durante 1 h cada 5 min. Se utilizaron dosis diagnósticas establecidas para *Aedes* sp. para Cuba en un tiempo de 30 min.¹⁷ Los resultados se analizaron siguiendo el criterio de diagnóstico recomendado por la OMS.¹⁸

Letalidad (%)	Diagnóstico de la resistencia
98-100	Susceptible
90-97	Verificación de la resistencia
< 90	Alta resistencia

RESULTADOS

En la [tabla](#) se muestran los valores de concentración del insecticida organofosforado temefos que causaron el 50 % (CL_{50}) y 90 % de letalidad (CL_{90}) en las cepas de *Ae. albopictus* Fraga, Zoológico y Boyeros. Se utilizó la cepa Fraga para el cálculo del nivel de resistencia a temefos, expresado como factor de resistencia FR_{50} y FR_{90} , pues mostró el valor más bajo de CL_{50} y CL_{90} , comparado con Zoológico y Boyeros. El valor de la pendiente de la recta probit-log de letalidad vs. dosis en la cepa Boyeros mostró el más elevado.

Los resultados de los bioensayos de susceptibilidad en mosquitos adultos demostraron que *Ae. albopictus* de la cepa Fraga resultó susceptible a todos los insecticidas, a los piretroides cipermetrina, lambdacialotrina y deltametrina, al organofosforado clorpirifos y a los carbamatos propoxur y bendiocarb; lo cual se

evidenció con una letalidad de 100 % a las dosis diagnósticas en 30 min de exposición para cada insecticida. Para los insecticidas piretroides, la letalidad del 100 % se alcanzó para deltametrina a los 30 min de exposición, para cipermetrina y lambdacialotrina se alcanzó a los 20 min. Para el organofosforado clorpirifos fue a los 20 min. Para los carbamatos propoxur y bendiocarb, la letalidad total se alcanzó a los 25 y 10 min, respectivamente (Fig. A).

Tabla. Valores de concentración que causa 50 % (CL₅₀) y 90 % (CL₉₀) de letalidad en larvas de *Ae. Albopictus* de las cepas Fraga, Zoológico y Boyeros, utilizando el insecticida organofosforado temefos. Además, se muestran los valores de pendiente de la recta Probit-log

Parámetros	Cepas <i>Aedes albopictus</i>		
	<i>Fraga</i>	<i>Zoológico</i>	<i>Boyeros</i>
^a CL ₅₀ (ppm)	0,0038 (0,0019-0,0059)	0,0032 (0,0062-0,062)	0,0079 (0,0062-0,062)
FR ₅₀	–	8,42	2,08
^a CL ₉₀ (ppm)	0,0093 (0,0059-0,0042)	0,116 (0,061-0,23)	0,012 (0,011-0,014)
^b FR ₉₀	–	12,47	1,29
^{cb} (± DE)	3,30 (± 0,28)	2,31 (± 0,19)	6,34 (± 0,19)

^a Concentración letal (CL₅₀ y CL₉₀) en mg/L, 95 % límites de confianza (LC) entre paréntesis.

^b Factor de resistencia (FR₅₀ y FR₉₀): CL₅₀ cepa a evaluar/CL₅₀ o CL₉₀ cepa susceptible Fraga.

^c Pendiente de la recta Probit-log, desviación estándar (± DE) entre paréntesis.

Número de larvas evaluadas: 1500 en cada cepa.

El diagnóstico de la resistencia para los adulticidas resultó en verificación de la resistencia en la cepa de Zoológico para deltametrina y lambdacialotrina, con un valor de letalidad a los 30 min de exposición a estos insecticidas de 90 %; sin embargo, resultó susceptible al organofosforado clorpirifos, con una letalidad de 100 % en 20 min y a los carbamatos propoxur en 15 min y a bendiocarb en 10 min (Fig. B).

La cepa de Boyeros resultó susceptible para todos los insecticidas, excepto para deltametrina, con una letalidad de 95 % a los 30 min de exposición, con un diagnóstico de verificación de la resistencia a los insecticidas deltametrina y lambdacialotrina (Fig. C).

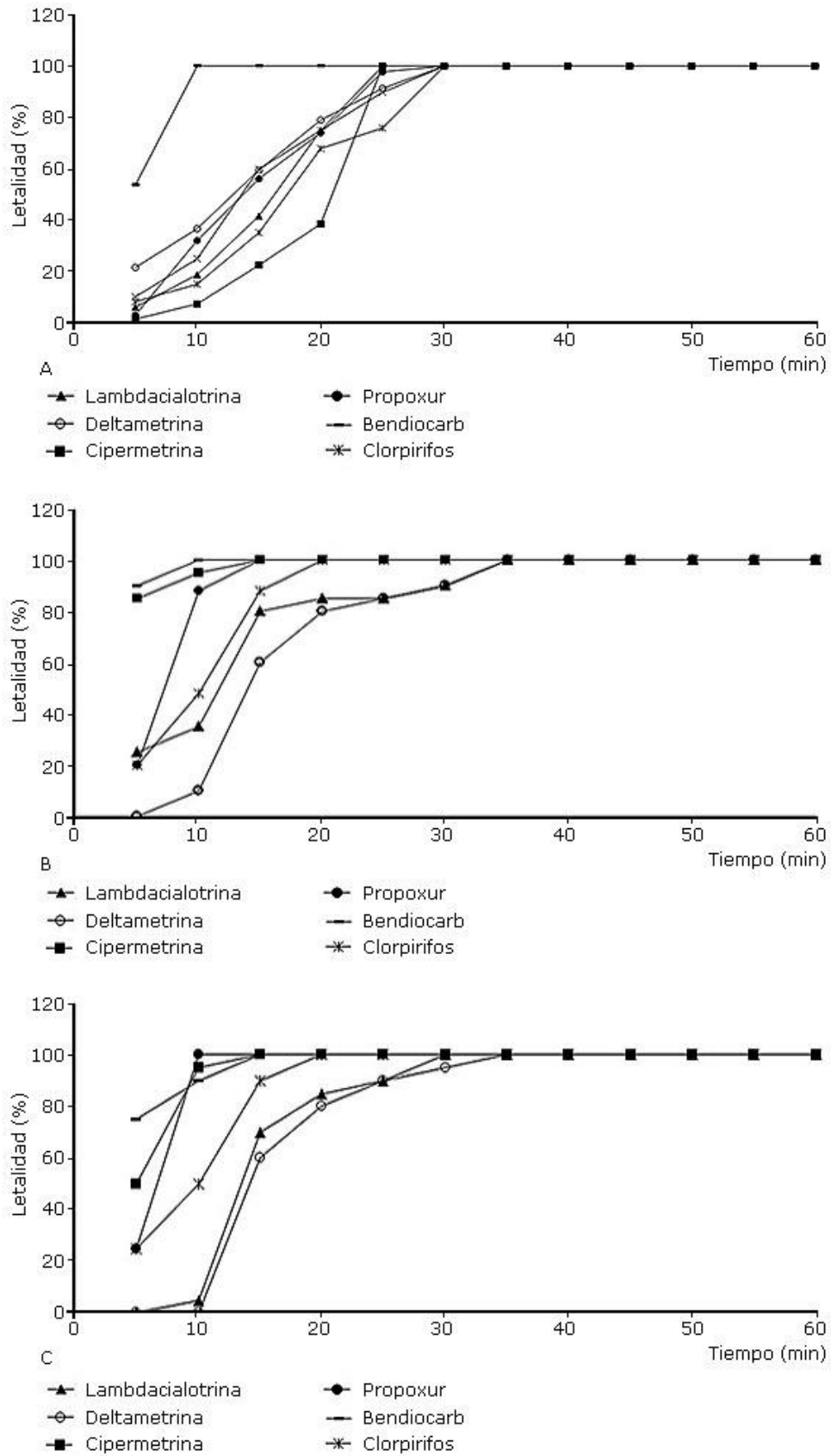


Fig. Nivel de resistencia a insecticidas en *Ae. Albopictus* de tres cepas de La Habana (A: Fraga, 2012; B: Zoológico, 2017 y C: Boyeros, 2017) en el estado adulto a los insecticidas piretroides (deltametrina, cipermetrina y lambda-cialotirina), al organofosforado clorpirifos y a los carbamatos propoxur y bendiocarb

DISCUSIÓN

Por la necesidad de disponer de una cepa de referencia de *Ae. albopictus* susceptible a insecticidas, se evaluaron tres cepas de esta especie con los principales insecticidas que se utilizan por el Programa Nacional de Control de Vectores en Cuba (piretroides, organofosforados y carbamatos). Al comparar los valores de concentración letal media (CL₅₀) para temefos con resultados obtenidos con cepas de referencia susceptibles a insecticidas y utilizando la misma metodología (OMS, 1981), se observó que el valor obtenido de CL₅₀ (0,0038 ppm) para temefos en la cepa de *Ae. albopictus* Fraga es 7,6 veces mayor al obtenido para la cepa de referencia de Estados Unidos ATM95 (CL₅₀= 0,0005 ppm),¹² sin embargo, resultó inferior al obtenido en las cepas Par-GR de Grecia (CL₅₀= 0,048 ppm)¹³ y la cepa Lab de Malasia (CL₅₀= 0,02 ppm).¹⁴

Al presentar la cepa Fraga los valores más bajos de concentraciones letales (CL₅₀ y CL₉₀), se utilizó como referencia para el diagnóstico de la resistencia a través del cálculo del factor de resistencia (FR₅₀ y FR₉₀), y se detectó que la cepa del Zoológico mostró de moderada a alta resistencia, y que la cepa Boyeros resultó susceptible. *Ae. albopictus* del Zoológico al estar en un área más cerrada y que se siempre ha mantenido un nivel de infestación de *Ae. aegypti*, a lo que se le suma el riesgo por la afluencia de personal nacional como extranjeros de países endémicos, ha estado expuesta a más actividades de control del programa, sobre todo al larvicida temefos, que los mosquitos colectados en el municipio Boyeros. Se ha demostrado que *Ae. albopictus* ha desarrollado resistencia al organofosforado temefos en Grecia y Florida^{13,19} y a carbamatos como propoxur y bendiocarb en países como Pakistan²⁰ y China²¹ y a deltametina en Africa.²² En un estudio realizado en la India se demostró resistencia incipiente a temefos y susceptibilidad a deltametrina y lambdacialotrina.²³ Se demostró que *Ae. albopictus* en Cuba es capaz de desarrollar resistencia a insecticidas, de ahí la importancia de realizar investigaciones que nos permitan hacer un uso correcto de insecticidas para un control efectivo de esta especie. La cepa Fraga fue la que mostró mayor susceptibilidad a insecticidas tanto en larvas como en adultos, comparada con las otras dos cepas evaluadas, resultados consistentes con la selección de esta cepa como referencia susceptible para los estudios de resistencia a insecticidas en esta especie y ahora nombrada FragaAlbS-CU (Fraga: lugar de colecta; Alb: *albopictus*; S: susceptible y CU: Cuba).

Conflicto de intereses

No se declara conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Benedict MQ, Levine RS, Hawley WA, Lounibos LP. Spread of the tiger: Global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. Vector Borne Zoonotic Dis. 2007;7:76-85.
2. Liu Z, Zhou T, Lai Z, Zhang Z, Jia Z, Zhou G, et al. Competence of *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes as Zika Virus Vectors, China. Emerg Infect Dis. 2017;23:1085-91.

3. Smartt CT, Stenn TMS, Chen TY, Teixeira MG, Queiroz EP, Souza Dos Santos, et al. Evidence of Zika Virus RNA Fragments in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) field-collected eggs from Camacari, Bahia, Brazil. *J Med Entomol.* 2017;54:1085-7.
4. Wong PS, Li MZ, Chong CS, Ng LC, Tan CH. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): A Potential Vector of Zika Virus in Singapore. *PLOS Negl Trop Dis.* 2013;7(8):e2348.
5. Organización Mundial de la Salud. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae *Aedes* to insecticides. WHO/VBC/81.807. Geneva: WHO; 1981.
6. Organización Mundial de la Salud. Instrucciones para determinar la susceptibilidad o resistencia en mosquitos adultos a los insecticidas, organoclorados, carbamatos, organofosforado. Establecimiento de la línea base. WHO/VBC/81.805. Ginebra: WHO; 1981.
7. Peiris HTR, Hemingway J. Mechanism of insecticide resistance in a temephos selected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) strain from Sri Lanka. *Bull Entomol Res.* 1990;80:453-7.
8. Saavedra K, Urdaneta L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernández I, et al. Mutations in the voltage gated sodium channel gene associated with permethrin resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molec Biol.* 2007;16:785-98.
9. Harris AF, Rajatileka S, Ransom H. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83(2):277-84.
10. Guías CDC 2010. Guideline for Evaluating Insecticide Resistance in Vectors Using the CDC Bottle Bioassay. Centers for Disease Control and Prevention; 2010.
11. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los insecticidas y lucha contra vectores. Serie de informes técnicos N. 44 317 o informe del Comité de Experto de la OMS en insecticidas. Geneva: OMS; 1970.
12. Marcombe S, Farajollahi A, Healy SP, Clark GG, Fonseca DM. Insecticide Resistance Status of United States Populations of *Aedes albopictus* and Mechanisms Involved. *PLOS ONE.* 2014;11:9(7):e101992.
13. Grigoraki L, Pipini D, Labbé P, Chaskopoulou A, Weil M, Vontas J. Carboxylesterase gene amplifications associated with insecticide resistance in *Aedes albopictus*: Geographical distribution and evolutionary origin. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(4):e0005533.
14. Ishak IH, Jaal Z, Ranson H, Wondji SCH. Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. *Parasites & Vectors.* 2015;8:181.
15. Mazarri MB, Georgiou GP. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations *Aedes aegypti* from Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc.* 1995;11:315-22.
16. Brogdon WG, McAllister JC. Simplification of adult Mosquito Bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *J Am Mosq Control Assoc.* 1998;14:159-64.

17. Rodríguez MM, Crespo A, Bisset JA, Hurtado D, Fuentes I. Diagnostic doses of insecticides for adult *Aedes aegypti* to assess insecticide resistance in Cuba. *J Am Mosq Control Assoc.* 2017;33:142-14.
18. World Health Organization. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. Geneva: World Health Organization; 2013.
19. Grigoraki L, Lagnel J, Kioulos I, Kampouraki A, Morou E, Labbé P, et al. Transcriptome Profiling and Genetic Study Reveal Amplified Carboxylesterase Genes Implicated in Temephos Resistance, in the Asian Tiger Mosquito *Aedes albopictus*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(5):e0003771. doi:10.1371/journal.pntd.000377
20. Arslan A, Rathor HR, Mukhtar MU, Mushtaq S, Bhatti A, Asif M, et al. Spatial distribution and insecticide susceptibility status of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in dengue affected urban areas of Rawalpindi, Pakistan. *J Vector Borne Dis.* 2016;53(2):136-43.
21. Yiguan W, Xin L, Chengling L, Su T, Jianchao J, Yuhong G, et al. A Survey of Insecticide Resistance in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) during a 2014 Dengue Fever Outbreak in Guangzhou, China. *J Econ Entomol.* 2017;1;110(1):239-44.
22. Ngoagouni C, Kamgang B, Brengues C, Yahouedo G, Paupy C, Nakouné E, et al. Susceptibility profile and metabolic mechanisms involved in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* resistant to DDT and deltamethrin in the Central African Republic Carine. *Parasites & Vectors.* 2016;9:599.
23. Bharati M, Saha D. Insecticide susceptibility status and major detoxifying enzymes' activity in *Aedes albopictus* (Skuse), vector of dengue and chikungunya in Northern part of West Bengal, India. *Acta Trop.* 2017;170:112-9.

Recibido: 23 de julio de 2018.

Aprobado: 4 de septiembre de 2018.

Juan A. Bisset. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía km 6 ½, La Lisa. La Habana, Cuba.
Correo electrónico: bisset@ipk.sld.cu