

Estudio preliminar sobre el comportamiento de *Aedes albopictus* de la region central de Venezuela a insecticidas químicos

Preliminary study on the behavior of Aedes albopictus from the central region of Venezuela to chemical insecticides

Darjaniva Molina de Fernández^{1*}, Danny Bastidas Beltrán¹, Nieves Molina, Luisa Figueroa¹, Juan Carlos Navarro³, Antonio Guerra¹, Julio González Rivas¹, Víctor Sánchez¹ & Rodrigo Ramírez

RESUMEN

Aedes albopictus es un competente vector del virus chikungunya, zika y de la mayor parte de los virus de encefalitis equina, capaz de transmitir al menos 24 arbovirus, susceptible a la infección (vertical y horizontalmente) por los serotipos del virus dengue. El objetivo fue realizar un estudio preliminar sobre el comportamiento frente a insecticidas organosintéticos de *Ae. albopictus* de diferentes localidades de tres estados centrales del país, durante el período 2012-2014. Se realizaron pruebas biológicas con botellas tratadas con insecticidas, según el método del CDC e igualmente evaluación bioquímica para identificar los mecanismos de detoxificación enzimáticos in vitro y mecanismos de resistencia in vivo con el sinergista butóxido de piperonilo (PB). Todas las cepas evaluadas presentaron sensibilidad al DDT (200 µg/mL) y cuatro de ellas a lambdacialotrina (6.25 µg/mL), solo una, Santos Michelena (SM) presentó valores de sobrevivencia. También esto fue observado con: malatión (100 µg/mL) con una mortalidad en 30 minutos de 42,6% para Carabobo; 46,2% Distrito Capital (DC); 69,6% Zamora y 75,5% Mario Briceño Iragorry (MBI), solo resultó sensible SM. En cuanto a fenitrotion se encontraron valores de sobrevivencia con mortalidades en 30 minutos de 72,2%; para Carabobo, 30,7% DC y 45,8% MBI; solo expresaron sensibilidad Zamora y SM. En las cepas Carabobo y DC se observó el efecto sinérgico FS = 3 y FS = 1,3, respectivamente. Se presume que los valores de sobrevivencia encontrados para insecticidas organofosforados pudiera asociarse con el incremento de esterasas alfa (α) y beta (β), en menor medida por la acetilcolinesterasa insensible (ACHEi) y las oxidasas con la sobrevivencia a lambdacialotrina en la cepa SM, lo cual podría comprobarse en estudios futuros a realizarse sobre resistencia a insecticidas. Los resultados encontrados en el presente trabajo, constituyen la base para su inicio a corto plazo en *Ae. albopictus* de Venezuela y la región, a fin de contribuir en la eficacia de las medidas de control químico de esta especie de importancia médica.

Palabras clave: *Aedes albopictus*, esterasas, insecticidas, resistencia, susceptibilidad.

SUMMARY

Aedes albopictus is a competent vector of chikungunya virus, zika and most of the equine virus, capable of transmitting at least 24 arboviruses, susceptible to infection (vertically and horizontally) by serotypes of the dengue virus encephalitis. The objective was to conduct a preliminary study on the behavior against *Ae. albopictus* organosynthetic insecticides from different locations in three central states of the country during the period 2012-2014. Bioassays with insecticide-treated bottles were performed according to the method of the CDC and also biochemical evaluation to identify the mechanisms of detoxification enzyme in vitro and in vivo mechanisms of resistance to the synergist piperonyl butoxide (PB). All strains tested showed sensitivity to DDT (200 µg / mL) and four of them lambdacyhalothrin (6.25 mg / mL), only one, Santos Michelena (SM) presented values of survival. This was also observed: malathion (100 µg / mL) with a mortality time (30 min) of 42.6% for Carabobo; 46.2% Capital District (DC); Zamora 69.6% and 75.5% Mario Briceño Iragorry (MBI) was sensitive only SM. As fenitrothion survival values encountered in the mortalities time (30 min) 72.2%; for Carabobo, 30.7% and 45.8% MBI DC; only expressed sensitivity Zamora and SM. In DC strains Carabobo and the synergistic effect was observed FS = 3 and FS = 1.3, respectively. It is presumed that the survival values found for organophosphate insecticides may be associated with increased esterase alpha (α) and beta (β), to a lesser extent insensitive acetylcholinesterase (ACHEi) and oxidases with survival to lambdacyhalothrin in strain SM, which could be verified in future studies to be carried out on insecticides resistance. The results found in the present work, constitute the basis for its short-term start in *Ae. albopictus* from Venezuela and the region, in order to contribute to the effectiveness of chemical control measures of this species of medical importance.

Keywords: *Aedes albopictus*, esterases, insecticide, resistance, susceptibility.

¹ Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA). S.A. Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon" (IAE-MPPS). Maracay, Venezuela

² Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

³ Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales, Quito, Ecuador

*Autor de correspondencia: darja2410@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) conocido como mosquito tigre asiático, es un insecto originario del sureste asiático responsable de la transmisión de 24 arbovirosis, entre ellas el virus dengue (DENV) (Reiter, 1998; Ibañez-Bernal, 1997), fiebre amarilla, encefalitis del este (EEEV), chikungunya (CHIKV), mayaro (Gratz, 2004) y zika (OPS & OMS, 2015). Históricamente, *Ae. aegypti* ha sido asociado como vector principal del virus dengue; *Ae. albopictus* mantiene un papel secundario en la transmisión de ciclos epidémicos en humanos. Ambas especies de mosquitos tienen un papel dual en la transmisión del virus chikungunya, una enfermedad que ha emergido recientemente en forma epidémica en Asia, países del Océano Índico y sureste de Europa (Charrel *et al.*, 2007) y el continente Americano (OPS, 2013). *Ae. albopictus* posee una plasticidad genética, fisiológica y ecológica capaz de adaptarse a pequeñas cantidades de agua, tiene un rango de vuelo rara vez superior a 500 metros además se ha encontrado compartiendo nichos ecológicos con *Ae. aegypti*, (Hawley, 1988). Se distribuye desde su país de origen hacia el continente de África, Europa meridional, algunas islas del Océano Pacífico y América (Hawley, 1988; Moore & Mitchell, 1997; Gratz, 2004). En América se detectó la presencia de *Ae. albopictus* a partir de los años ochenta en países como Estados Unidos y Brasil (Forattini, 1986; Mitchell, 1995). En Venezuela, fue reportado por primera vez en la ciudad de Caracas por Navarro *et al.*, (2009), seguidamente se ha reportado en el estado Aragua, en los municipios Santos Michelena localidad de Tiara (Ramírez *et al.*, 2012) y Mario Briceño Iragorry (Martiradonna *et al.*, 2013), en los estados Guárico y Monagas (Quinto *et al.*, 2013) y más recientemente en Bolívar (Rubio-Palis *et al.*, 2015). A esta especie se le considera uno de los vectores más invasores de la última década con la mayor dispersión geográfica a nivel mundial (Benedict *et al.*, 2007). Al no contar aún con una vacuna efectiva para estos virus, las estrategias de control de estos vectores de enfermedades se basan principalmente en el saneamiento ambiental, la educación sanitaria, la participación social que permita lograr acciones sostenibles en el tiempo, con el fin de eliminar los hábitats y como última opción el control químico vectorial, considerándose fundamentalmente durante brotes epidémicos (Rodríguez, 2000). Sin embargo el control de las especies de mosquitos ha presentado

dificultades, lo cual ha traído como consecuencia la expansión de virus a muchas áreas endémicas, por lo que el uso de los insecticidas sigue siendo crucial e indispensable, para contribuir en la reducción de los riesgos de la transmisión de las arbovirosis como el dengue y el chikungunya (Grieco *et al.*, 2007). Los insecticidas organosintéticos de varias clases han sido usados en Venezuela para el control vectorial de mosquitos transmisores de dengue. Entre estos químicos, los organofosforados en diferentes tipos de formulaciones y en menor frecuencia los piretroides. Sin embargo combinaciones de piretroides en algunos casos con sinergistas como el butóxido de piperonilo, son formulaciones comúnmente usadas a nivel doméstico.

El uso inadecuado o excesivo de la herramienta química en el control vectorial, ha traído como consecuencia la selección de poblaciones de vectores resistentes a insecticidas, lo cual ha derivado preocupación e interés debido a que la biología de *Ae. albopictus* es similar a la de *Ae. aegypti*, es frecuentemente recolectado en recipientes naturales y artificiales donde coexisten con otras especies (Hawley, 1988); existiendo la probabilidad de que *Ae. albopictus* este siendo fuertemente presionado con insecticidas químicos, empleados para el control de *Ae. aegypti* pudiendo esto generar resistencia de una forma indirecta. La resistencia es un problema creciente que imposibilita el control vectorial de estas especies, para una mejor comprensión del fenómeno es necesario el monitoreo con el fin de seleccionar los insecticidas de forma adecuada, y por ende el éxito en los programas de control vectorial. Existen estudios donde se ha reportado resistencia de *Ae. albopictus* a insecticidas así: en Vietnam a malatión, en Malasia a fenitrotión, en Madagascar a fenitrotion; también se ha reportado resistencia en África, India, Sur este de Asia, Filipinas y Japón al organoclorado DDT (Brown, 1986 Somboon *et al.*, 2003, Thanispong *et al.*, 2008, Kamgang *et al.*, 2011, Momi & Prafulla 2014). La llegada y colonización de *Ae. albopictus* se data en América, en 1985 específicamente en Texas, USA (Mitchell, 1995). En el continente americano es escasa la información en resistencia de *Ae. albopictus*. Los casos registrados en América han sido reportados en Estados Unidos, donde encontraron resistencia al DDT y malatión, y susceptibilidad a los piretroides (Marcombe *et al.*, 2014), otro estudio realizado en Brasil con insecticidas biológicos concluyó que *Ae. albopictus* presenta una respuesta diferente a *Ae. aegypti* (Duque & Navarro, 2005). Hasta ahora

no existen casos registrados de resistencia en Sur América, por ello nos hemos planteado como objetivo estudiar la resistencia a insecticidas organosintéticos en *Ae. albopictus* en localidades procedentes del centro de Venezuela, con la finalidad de contar con información necesaria para su control.

MATERIALES Y MÉTODOS

La muestra para los bioensayos estuvo comprendida por mosquitos adultos de *Ae. albopictus*, obtenidos a partir de material inmaduro (larvas y pupas) recolectado de recipientes en los que el agua se conservó por periodos superiores a una semana, sin ser renovada como: tanques sin tapa, pipotes, latas, floreros y otros semejantes, ubicados en los solares y preferiblemente en lugares sombreados de los cementerios y algunos jardines de las diferentes localidades, seleccionadas por ser los primeros lugares en reportar la presencia de *Ae. albopictus*. Para ello, se aplicaron los métodos sugeridos por la Organización Mundial de la Salud, utilizando cucharones, goteros y succionadores (OMS, 1993). El material fue trasladado al Laboratorio de Biología de Vectores y Reservorios del Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA), perteneciente al Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldon” (IAE).

Poblaciones de estudio

Durante el año 2012, se capturaron en el estado Aragua: municipios Santos Michelena (SM), 10°7'56.34"N, 67° 9'16.67"O; para el año 2013, en Mario Briceño Iragorry (MBI) 10°16'45.69"N, 67°35'44.43"O y para el año 2014, en Zamora 10° 5'58.00"N, 67°36'54.41"O. De igual manera, en el estado Carabobo: municipio Naguanagua, 10°16'13.4"N, 67°34'50.0"O y Montalbán 10°12'42.28"N, 68°19'34.39"O. Durante el año 2013, se recolectaron en el Distrito Capital, municipio Sucre, estado Miranda: Parque Generalísimo Francisco de Miranda, 10°29'42.60"N, 66°50'32.84"O, Jardín Botánico de la Universidad Central de Venezuela (UCV) 10°29'49.23"N, 66°53'29.51"O y Cementerio General del Sur 10°28'47.08"N, 66°55'24.47"O.

Cría de mosquitos

Las larvas colectadas fueron colocadas en cubetas plásticas rotuladas que contenían agua

decolorada, las condiciones de cría fueron 28°C +/- 2°C de temperatura, 70% +/- 5% de humedad relativa y un fotoperiodo de 12:12 (luz: oscuridad). Las larvas fueron alimentadas con un compuesto de Ictiosan® alimento para peces y levadura de cerveza. Las pupas se colocaron en envases plásticos pequeños se introdujeron en una jaula de tela tipo dopiovelo con estructura de hierro, luego fueron llevadas a un ambiente húmedo a 25°C, una vez en la jaula pasaron a su fase adulta donde los mosquitos quedaron atrapados. En la jaula los mosquitos machos se alimentaron con solución azucarada al 10% y las hembras se alimentaron cada tres días con sangre de *Columba livia* (paloma doméstica).

Para las oviposturas se introdujo en la jaula un envase plástico de 250 mL el cual contenía papel absorbente blanco y un volumen de agua de 200 mL. El papel absorbente fue retirado en 72 horas y después rotulado con sus respectivos datos de origen, fecha y generación filial. Una vez seco, se almacenó en recipientes de plástico hermético. Posteriormente, un número de huevos suficientes se colocaron en agua para su eclosión y así se repitió el ciclo hasta la obtención de adultos de la generación filial 1, 2 y 3 (F1, F2 y F3) los cuales fueron utilizados para los bioensayos (Alarcon-Elbal *et al.*, 2010)

Insecticidas

Organoclorado: DDT (98%), organofosforados: malatión (96%) y fenitrotión (99,5%), piretroide lambdacialotrina (70%), en presentación grado técnico, sin valor comercial, y suministrados por Insecticidas Internacionales Compañía Anónima (INICA®). Los insecticidas fueron evaluados, a la dosis diagnósticas determinadas en el laboratorio de evaluación de insecticidas del CEEESA (Molina de Fernández *et al.*, 2013).

Pruebas Biológicas

Se realizaron siguiendo el método de las botellas del CDC (Brogdon y McAllister, 1998). Los mosquitos adultos *Ae. albopictus* fueron expuestos a botellas de vidrio tipo Wheaton de 250 ml, tratadas con soluciones cetónicas de insecticidas, las cuales se usaron como cámaras de prueba para detectar la resistencia o susceptibilidad a los insecticidas en mosquitos adultos. Estas fueron preparadas en el Laboratorio de Evaluación de Insecticidas del

CEEESA, IAE “Dr. Arnoldo Gabaldon” siguiendo metodología estandarizada por Figueroa *et al.*, (2006). Los ensayos se realizaron en el Laboratorio antes referido, a temperaturas aproximadas de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ y humedad relativa de $55\% \pm 5$. Se expusieron aproximadamente 15 ± 2 mosquitos adultos hembras por botella de tres días de edad entre F1 y F3, alimentados exclusivamente con solución azucarada al 10%. Se evaluaron cuatro réplicas por cada concentración de insecticida y dos réplicas como grupo control en el cual solo se trató la botella con acetona. Cada bioensayo se realizó por triplicado el mismo día de ejecución. Se registró la mortalidad cada 15 min hasta el tiempo en el que se logró el 100% de mortalidad, de esta manera se determinó el efecto del insecticida en función del tiempo de exposición. La mortalidad en el control, entre 5 y 20% se corrigió aplicando la fórmula de Abbot (1925). Se relacionaron las variables tiempo-mortalidad, graficando los porcentajes de mortalidad en el eje de las abscisas (X) y el tiempo en el eje de las ordenadas (Y), haciendo uso de Excel® 97-2003; obteniendo la línea gráfica de la tasa de mortalidad de la cepa a cada insecticida en el mismo plano, correspondiente a la dosis diagnóstica.

La determinación de mecanismos de resistencia a insecticidas *in vivo*, con el sinergista Butóxido de piperonilo (PB), se realizó solo en aquellas cepas que resultaron resistentes al malatión, por lo que fueron expuestas a una mezcla del insecticida malatión (100 $\mu\text{g/L}$) con una concentración subletal de (PB), (1 $\mu\text{g/L}$), siguiendo el método de las botellas del CDC (Brogdon & McAllister, 1998). Se calculó el Factor de sinergismo (FS) determinado por el coeficiente de la relación de los valores del tiempo de mortalidad del insecticida solo entre el tiempo de mortalidad de la mezcla insecticida sinergista, cuyo valor mayor a uno ($\text{FS} > 1$) es indicativo de sinergismo, es decir de la inhibición de la actividad enzimática por el sinergista (Vassena *et al.*, 2000).

Criterio de mortalidad

Situación en la que el insecto se encuentra sin ningún movimiento evidente de cualquier apéndice después de la observación por un mínimo de 3 segundos.

Pruebas Bioquímicas

Para determinar *in vitro* resistencia metabólica y no metabólica (alteración en sitio blanco ACHEi) se realizaron pruebas en placas para microtitulación. Estas consistieron en detectar la presencia de mecanismos de resistencia específicos en insectos individuales que podrían aclarar posibles causas de la resistencia. Cada mosquito fue triturado en 50 μL de solución tampón pH 7,5 y 0,05 M y se le añadió 0,5 mL de la misma solución. Se tomaron alícuotas de 50 μL de cada muestra que fueron colocadas en placas para microtitulación de 96 pocillos. Se evaluaron cinco sistemas enzimáticos que confieren resistencia a insecticidas; esterasas alfa (α) y beta (β), acetilcolinesterasa normal (AChe), acetilcolinesterasa inhibida (ACHei) y oxidasas. Los sustratos utilizados en cada caso incluyen alfa y betanaftil acetato para las esterasas no específicas, el yoduro de acetiltiocolina se usó para evidenciar la presencia de la AChE y para la AChEi además se utilizó el insecticida carbamato propoxur y para las oxidasas se utilizó el TMBZ (3,3',5,5'-Tetrametil Benzidina). Se midieron los valores de absorbancia en un lector de ELISA (Ensayo Inmuno Absorbente Ligado a Enzimas), Multiskan Plus de Fisher Scientific, empleando filtros de 405 nm para AChE y AChEi, para las esterasas y oxidasas, se empleó un filtro de 620 nm (Brogdon *et al.*, 1997; Hemingway J. 1998; Figueroa *et al.*, 2006., Molina de Fernández y Figueroa, 2009). A los valores de absorbancia se les aplicó estadística descriptiva, Análisis de Varianza de una sola vía, no paramétrico de Kruskal Wallis a un nivel de significación del 95% ($\alpha = 0,05$).

RESULTADOS

Pruebas Biológicas

En la Fig. 1 se presentan los resultados obtenidos con el insecticida DDT (200 $\mu\text{g/mL}$), donde se evidencia que todas las cepas evaluadas presentaron el 100% de mortalidad a los 45 min. En la Fig. 2 se presentan los resultados con el insecticida malatión (100 $\mu\text{g/mL}$), encontrándose que la cepa Santos Michelena (SM) presentó el 100% de mortalidad en el menor tiempo de exposición (30 min), el resto de las cepas expresaron menores porcentajes: 42,6% para Carabobo; 46,2% Distrito Capital (DC); 69,6% Zamora y 75,5%, Mario Briceño Iragorry (MBI). Carabobo y Zamora

Fig. 1. Datos tiempo-mortalidad en adultos de *Aedes albopictus* de la región central de Venezuela expuestos al insecticida organoclorado DDT a una concentración de 200 µg/ml por botella.

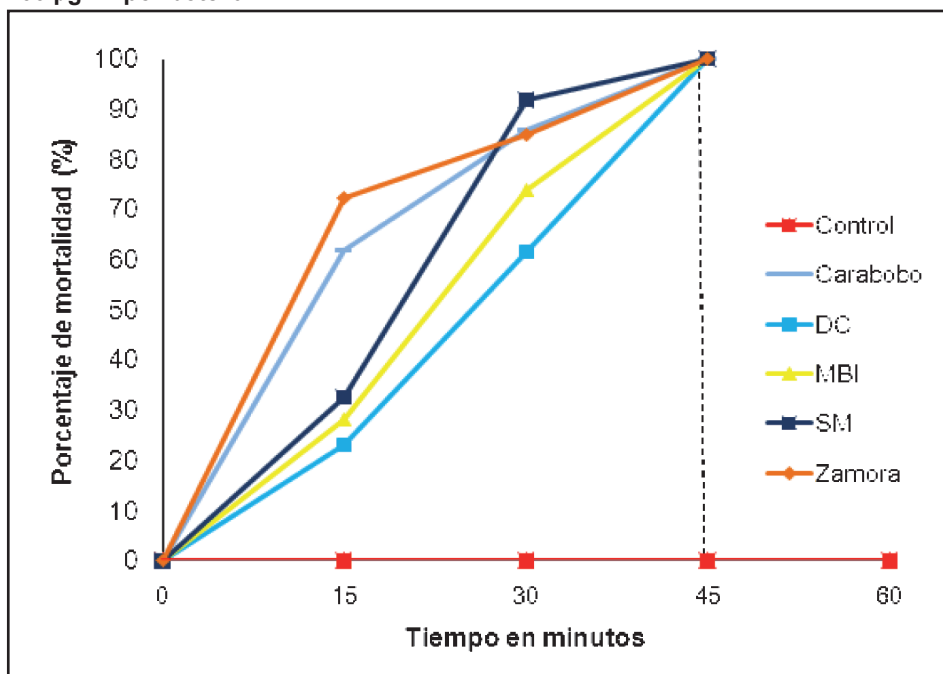
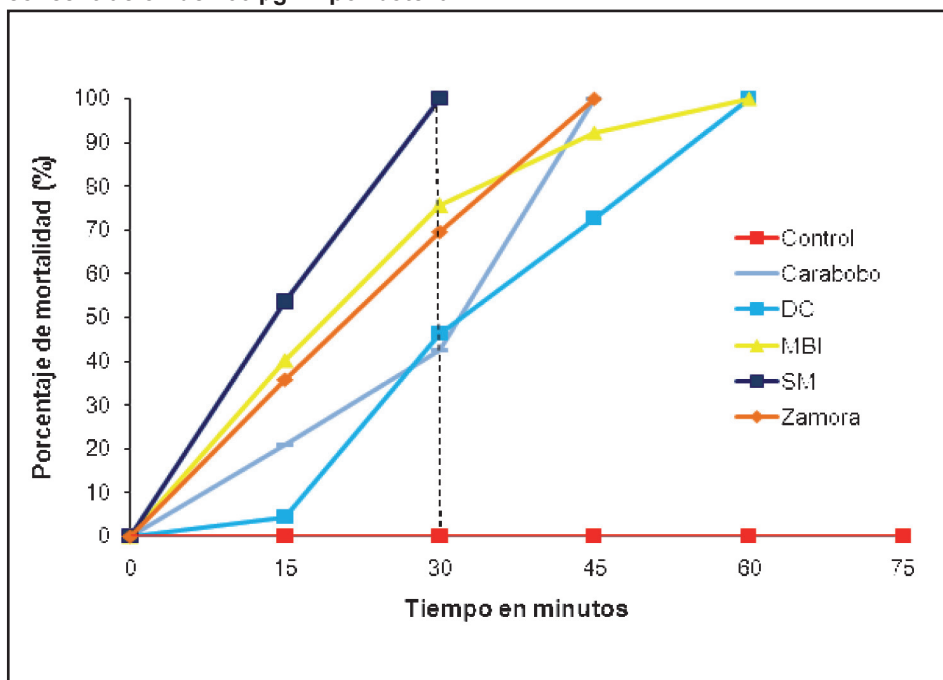


Fig. 2. Datos tiempo-mortalidad en adultos de *Aedes albopictus* de la región central de Venezuela expuestos al insecticida organofosforado malatión a una concentración de 100 µg/ml por botella.



obtuvieron el 100% de mortalidad a los 45 min; DC y MBI a los 60 min.

En la Fig. 3 se muestran los resultados con el insecticida fenitrotion (100 µg/mL), visualizándose que las cepas SM y Zamora presentaron el 100% de mortalidad en 30 min; el resto de las cepas expresaron valores de: 72,2% para Carabobo; 30,7% Distrito Capital (DC) y 45,8% Mario Briceño Iragorry (MBI). Carabobo mostró el 100% de mortalidad a los 45 min; DC y MBI a los 60 min.

En la Fig. 4 se presentan los resultados al evaluar el insecticida piretroide lambdacialotrina (6,25 µg/mL) encontrándose que cuatro de las cepas evaluadas presentaron el 100% de mortalidad a los 15 min, y la cepa SM presentó el 100% de mortalidad a los 30min.

En las Figs. 5 y 6 se presentan los resultados de la determinación de los mecanismos de resistencia a insecticidas in vivo. Al evaluar la cepa Carabobo (Fig. 5) frente al insecticida malatión solo y con la mezcla malatión + el sinergista (PB), siendo una de las cepas que presentó el menor porcentaje de mortalidad al malatión (42,6% en 30 min). Se

evidenció el efecto sinérgico, al obtener en la cepa el 100% de mortalidad en 45 min con el malatión solo y con la mezcla malatión + el sinergista (PB), en 15 min obteniendo un FS=3. En la Fig. 6 se observa en la cepa DC también un efecto sinérgico con una mortalidad a los 60 min con el insecticida solo; y con el sinergista a los 45 min, se obtuvo un FS = 1,3. Los tiempos de mortalidad obtenidos al evaluar el malatión sin PB, disminuyeron como consecuencia de la acción del sinergista tanto en la cepa Carabobo como en la cepa DC.

Pruebas Bioquímicas

En la Tabla I se presenta un resumen de los resultados de los mecanismos de resistencia a insecticidas in vitro, representados por la media de las absorbancias y sus valores de desviación estándar, para cada una de las determinaciones realizadas, se muestran los valores en la cepas evaluadas. La cepa SM fue la que presentó los niveles más bajos de esterasas α y β , AChE y AChEi, y los niveles más altos de oxidasas. Los niveles de esterasas (α) fueron mayores en las cepas: MBI y Zamora y el análisis de Kruskal Wallis demostró que existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$)

Fig. 3. Datos tiempo-mortalidad en adultos de *Aedes albopictus* de la región central de Venezuela expuestos al insecticida organofosforado fenitrotion a una concentración de 100 µg/ml por botella

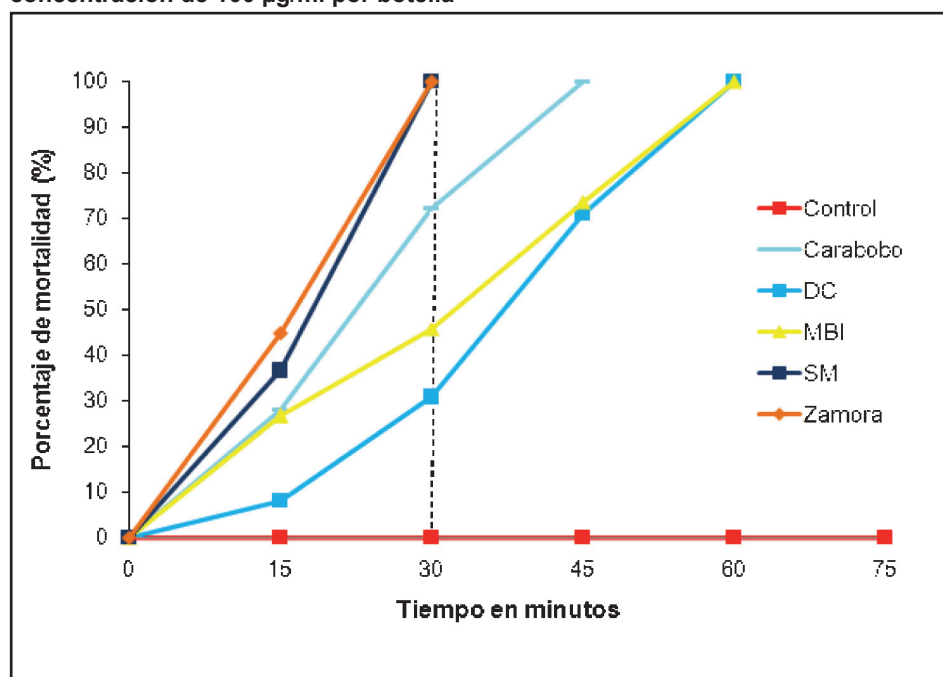


Fig. 4. Datos tiempo-mortalidad en adultos de *Aedes albopictus* de la región central de Venezuela expuestos al insecticida piretroide lambdacialotrina a una concentración de 6,25 µg/ml por botella.

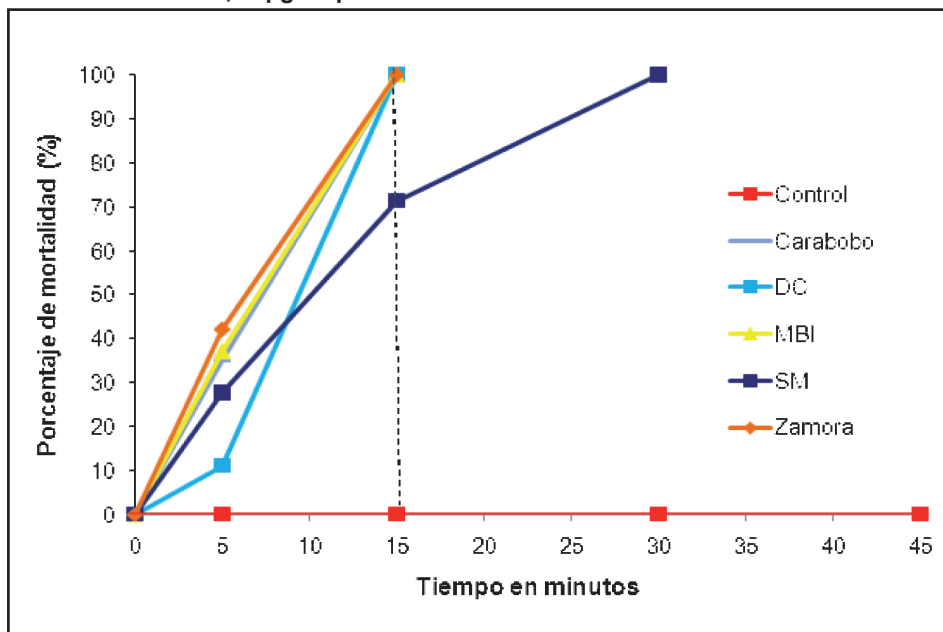


Fig. 5. Datos tiempo-mortalidad en adultos de *Aedes albopictus* cepa Carabobo expuestos al insecticida organofosforado malation (100 µg/ml) y el sinergista butóxido de piperonilo (PB) (1µg /ml) .

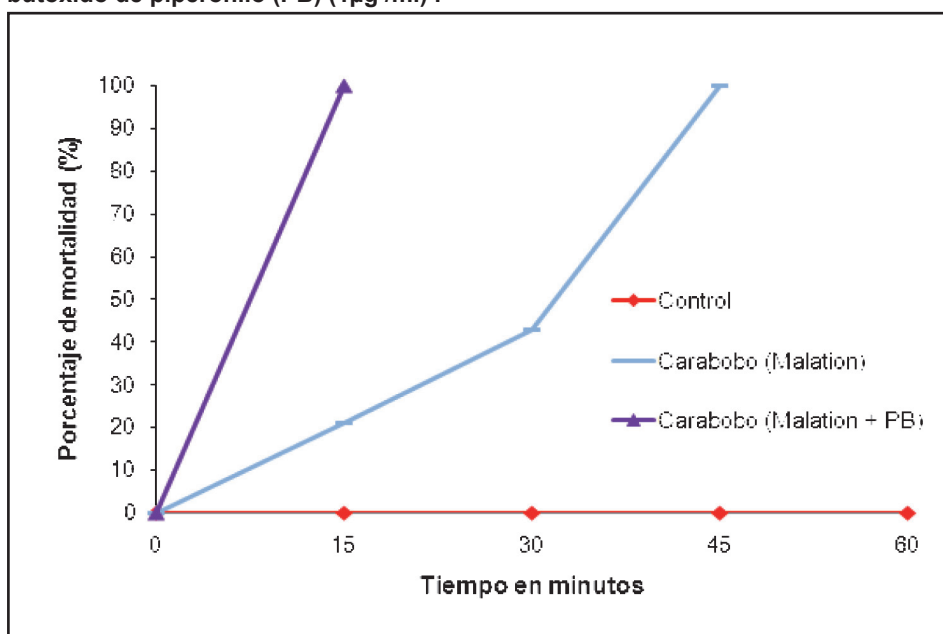
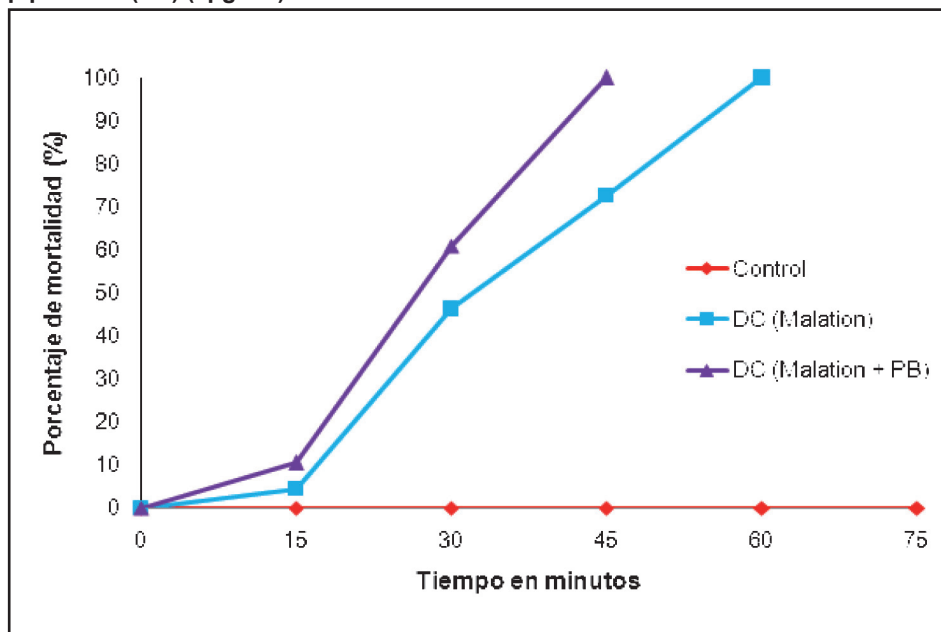


Fig. 6. Datos tiempo-mortalidad en adultos de *Aedes albopictus* cepa DC expuestos al insecticida organofosforado malation (100 µg/ml) y el sinergista butóxido de piperonilo (PB) (1µg /ml).



entre las cepas. Así tenemos que SM, Carabobo y DC, pertenecen al mismo grupo. Con respecto a las esterasas (β) existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre la cepas, solo Carabobo y DC son estadísticamente iguales, los niveles más altos se encontraron en MBI y Zamora. En cuanto a las AChE y AChEi se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$), donde solo se encontraron valores mayores de AChE y AChEi en DC y Zamora y para AChEi en Carabobo. Al evaluar las oxidasas se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre las cepas, solamente las cepas DC, MBI, pertenecen al mismo grupo, los niveles más bajos se observaron en la cepa Zamora.

DISCUSIÓN

Todos los insecticidas químicos ejercen en mayor o menor extensión, presión selectiva sobre las poblaciones de insectos que intentan controlar. El tiempo necesario para el desarrollo de resistencia depende de numerosos factores incluyendo la frecuencia y naturaleza de los genes de resistencia, las estrategias para su manejo, las dosis y frecuencias de

aplicación de los insecticidas y la eficacia biológica de las poblaciones resistentes en relación con las susceptibles. El malatión es uno de los principales insecticidas que se ha empleado en América desde los años 80. En Venezuela es el adulticida usado en aplicación espacial en el control vectorial del dengue. Las evaluaciones realizadas en el presente estudio con *Ae. albopictus*, mostraron que todas las cepas evaluadas expresaron mayor sobrevivencia al malatión y al fenitrotion, a excepción de la cepa SM que resultó mas susceptible a los tiempos que tardaron para morir en ambos insecticidas, a pesar de que el fenitrotión ha sido de uso menos frecuente en control vectorial del dengue en el país.

Las esterasas elevadas han estado involucradas en la resistencia a los insecticidas organofosforados y en menor medida en la resistencia a los piretroides y carbamatos, diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) en las cepas evaluadas indican que este mecanismo pudiera estar asociado con los valores encontrados de sobrevivencia a los organofosforados. Aun cuando no se hicieron estudios genéticos, el principal mecanismo de resistencia metabólica ocurre debido a

Tabla I. Mecanismos de resistencia in vitro (media y desviación estándar) de *Aedes albopictus* de la región central de Venezuela.

Cepas	Mecanismos Enzimáticos Evaluados				
	Esterasas alfa	Esterasas beta	AChe	ACheI	Oxidasas
SM	1,050* +/- 0,127	0,981* +/- 0,075	0,140* +/- 0,040	0,092* +/- 0,013	0,423* ^a +/- 0,163
Carabobo	1,082* +/- 0,066	1,100* +/- 0,062	0,126* +/- 0,014	0,138* ^a +/- 0,018	0,299* ^a +/- 0,152
DC	1,115* +/- 0,153	1,071* +/- 0,144	0,211* ^a +/- 0,069	0,131* ^a +/- 0,018	0,260* +/- 0,090
MBI	1,282* ^a +/- 0,107	1,307* ^a +/- 0,088	0,095* +/- 0,012	0,094* +/- 9,77E-03	0,269* +/- 0,085
Zamora	2,051* ^a +/- 0,0983	1,422* ^a +/- 0,072	0,160* ^a +/- 0,016	0,136* ^a +/- 0,01	0,239* +/- 0,060

*Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$); a: presentaron los valores más elevados.

un incremento en expresión o actividad de tres de las principales familias de enzimas dentro de las cuales están involucradas las esterasas (Hemingway & Ranson, 2000; Flores *et al.*, 2007). Bioquímicamente, las esterasas actúan uniéndose rápidamente al insecticida secuestrando a este, antes de que llegue a su sitio de acción, lo que requiere altas cantidades de estas enzimas, desencadenando la sobreproducción enzimática y por ende el desarrollo de resistencia (Karunaratne *et al.*, 1993). Los insecticidas organofosforados, al igual que los carbámicos ejercen su acción tóxica mediante la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (ACheI) (Saume, 1992). Esta pareciera estar involucrada además de las esterasas como la razón de los valores encontrados en relación a las otras cepas; Carabobo, DC y Zamora. Se desconoce si los individuos que presentaron sobrevivencia a los organofosforados llegaron al país con esa característica o son producto de la presión de selección ejercida por el uso de organofosforados para el control de *Ae. aegypti* en la región. El sinergista PB potenció la acción del insecticida malatión; mediante la inhibición de la actividad enzimática posiblemente involucrada en el comportamiento de sobrevivencia de los individuos.

Por otra parte, los valores de susceptibilidad encontrados al DDT y al piretroide lambdacialotrina, puede relacionarse con los bajos valores obtenidos de oxidasas, solo la cepa SM que presentó altos niveles de esta enzima, posiblemente relacionados con los valores de sobrevivencia encontrados para este insecticida. Esto en concordancia con lo reportado por González y Salazar (2015), quienes

realizaron estudios moleculares de la región ITS2II cromosómica y evidenciaron heterogeneidad en los tamaños de la región ITS2 de los individuos de la población de Santos Michelena (SM), de lo cual se puede inferir que: 1) Los individuos que se encuentran en SM provienen de una población invasora distinta al resto de las poblaciones estudiadas, o 2) Existe una alta tasa de variabilidad intraespecífica en la región ITS2 en esta especie de mosquitos.

Estudios sobre comportamiento frente a insecticidas en *Ae. albopictus* están pobremente documentados ya que los mismos se han enfocado principalmente en vectores de malaria y dengue, específicamente *Ae. aegypti*. Se encuentran reportados estudios principalmente en Asia y en menor frecuencia en Europa, África y América, empleando insecticidas biológicos, *Bacillus thuringiensis israelensis* (Duque & Navarro, 2005), y químicos tales como: temefos, malatión, fenitrotión, permetrina, lambdacialotrina, deltametrina, DDT, propoxur entre otros (Ponlawat *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2011; Kamgang *et al.*, 2011; Pocquet *et al.*, 2014).

Marcombe *et al.* (2014), encontraron en *Ae. albopictus* resistencia al malatión y susceptibilidad a piretroides; el mecanismo involucrado para la resistencia al organofosforado evaluado por sobreexpresión de esterasas (β) y Glutathion-S-Transferasas (GST), reportaron resistencia al DDT, atribuyendo la resistencia a las (GST), asociadas principalmente con la resistencia a DDT (Clark *et al.*, 1984) organofosforados y piretroides (Kostaropoulos *et al.*, 2011; Vontas *et al.*, 2002).

Otro estudio realizado por Kamgang *et al.* (2011), hallaron susceptibilidad al fenitrotion y resistencia al DDT en *Ae. albopictus* de África Central, pero no encontraron resistencia cruzada entre DDT y el piretroide deltametrina sugiriendo la participación de la resistencia metabólica y no modificación del sitio diana (IRAC, 2006). Pethuan *et al.* (2007) encontraron susceptibilidad en *Ae. albopictus* a los insecticidas: deltametrina, permetrina, fenitrotion y propoxur, obteniendo niveles enzimáticos muy bajos, que se corresponde a su condición de susceptibilidad a los insecticidas evaluados.

Los resultados encontrados en el presente trabajo, constituyen una referencia para el inicio de estudios de resistencia a insecticidas de *Ae. albopictus* en Venezuela y la región, a fin de contribuir en la eficacia de las medidas de control químico vectorial de esta especie

Conflicto de intereses

Los autores del trabajo declaramos que no existen conflictos de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a: los árbitros por su importante contribución en la revisión de este artículo, a la Dirección de Investigación del IAE; al personal del Centro de Estudio de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA) adscrito al IAE, especialmente al personal Técnico del Laboratorio de Biología de Vectores y Reservorios por el excelente trabajo realizado en el desarrollo de las Cepas. Esta investigación fue financiado por el IAE, Ministerio del Poder Popular Para la Salud.

REFERENCIAS

- Abbott W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* **18**: 265-267.
- Alarcon-Elbal, P., Delacour, S., Pinal, R., Ruiz-Arredondo, I., Muñoz, A., *et al.* (2010). Establecimiento y mantenimiento de una colonia autóctona española de *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894, (Diptera, Culicidae) en laboratorio. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.* **69**: 140-148.
- Benedict MQ., Levine RS., Hawley WA. & Lounibos P. (2007). Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vect Borne Zoo Dis.* **7**: 76-85.
- Brown A.W.A. (1986) Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J. Amer. Mosq. Control. Assoc.* **2**: 123-140.
- Brogdon W. & Baber A. (1990). Fenitrotion-deltametrina cross-resistance conferred by esterases in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Pestic Biochem Physiol.* **3**: 130-139.
- Brogdon W., McAllister J. & Valule J. (1997). Hemeperoxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *J Am Mosq Control Assoc.* **13**: 233-237.
- Brogdon W. & McAllister J. (1998). Simplification of adult mosquito bioassays through use of time mortality determinations in glass bottles. *J. Amer. Mosq. Control. Assoc.* **14**: 159-154.
- Chadwick P., Invest J. & Browron M. (1977) An example of cross-resistance to pyrethroids in DDT-resistance *Aedes aegypti*. *Pestic. Sc.* **8**: 618-624.
- Charrel R. N., de Lamballerie X. & Raoult D. (2007) Chikungunya outbreaks, the globalization of vectorborne diseases. *N. Engl. J. Med.* **356**: 769-771.
- Chuaycharoensuk T., Juntarajumnong W., Boonyuan W., Bangs M., Akranakul P., Thammapalo S., *et al.* (2011). Frequency of pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *J Vector Ecology.* **36**: 204-211.
- Clark A. & Shamaan N. (1984). Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the housefly is glutathione S-transferase. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **22**: 249-261.
- Duquet J. & Navarro M. (2005). Susceptibilidad de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) en de Sao Pablo Brasil al *Bacillus Thuringiensis* Var israeliensis. *Rev Colomb de Entomol.* **31**: 99- 201.

- Figueroa Acosta L. E., Marín Álvarez M., Pérez Pinto E. & Molina de Fernández D. (2006). Mecanismos de resistencia a insecticidas organosintéticos en una población de *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae) del estado Aragua. *Bol. Mal. Salud Amb.* **46**: 39-47.
- Forattini O. P. (1986). Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. *Rev Saúde Pública.* **20**: 244-245.
- Flores A., Salomon J., Fernandez I., Ponce G., Loaiza M., Lozano S., et al. (2007). Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L) from Quintana Roo, southern Mexico. *J. Amer. Mosq. Control. Assoc.* **22**: 672-677.
- González M. F. & Salazar M. (2015). Diferencias moleculares intraespecíficas del mosquito *Aedes albopictus*. Memorias de las XXII Jornadas Científicas “Dr. Arnoldo Gabaldon”.
- Gómez A., Seccacini E., Zerba E. & Licastro S. (2011) Comparison of the insecticide susceptibilities of laboratory strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **106**: 993-996.
- Gratz N. G. (2004). Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *J. Medi and Veterinary Entomol.* **18**: 215-227.
- Grieco J., Achee N., Chareonviriyaphap T., Suwonkerd W., Chauhan K., Sardelis M. & Roberts D. R. (2007). A new classification system for the actions of IRS chemicals traditionally used for malaria control. *Ploss one* **2**:e716.
- Hawley W. A. (1988). The biology of *Aedes albopictus*. *J of the American Mosq Control Association.* **4**: 2-39.
- Hemingway J. (1998). *Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual)*. World Health Organization. Geneva.
- Hemingway J. & Ranson H. (2000). Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annu Rev. Entomol.* **45**: 371-391.
- Ibáñez-Bernal B. B. S., Mutebi J. P., Argot E. & Rodriguez G. (1997). First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. *Med. Vet. Entomol.* **11**: 305-309.
- IRAC (2006). *Prevention and management of insecticide resistance in vector and pests of public health importance*. Insecticide Resistance Action Committee. USA: Crop Life.
- Kamgang B., Marcombe S., Chandre F., Nchoutpouen E., Nwane P., Etang J., Corbel V & Paupy C. (2011). Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in África Central. *Parasites & Vector.* **4**: 79-86
- Karunaratne S., Jayawar-Dena K., Hemingway J. & Ketterman A. (1993). Characterization of a B-type esterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochem J.* **339**: 575-579.
- Khan H. A. A., Akram W., Shehzad K & Shaalan E. (2011). First report of field devolved resistance to agrochemicals in dengue mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), from Pakistan. *Parasites & Vector.* **4**: 146-156
- Kostaropoulos I., Papadopoulos A., Metaxakis A., Boukouvala E. & Papadopoulo M. (2011). Glutathione S-transferase in defense against pyrethroid insecticides. *Biochemistry & Molecular Biology Insect.* **31**: 313-319.
- Kushwah R. B. S., Mallick P. K., Ravikumar H., Dev V., Kapoor N., Adak T & Singh O. P. (2015). Status of DDT and pyrethroid resistance in Indian *Aedes albopictus* and absence of Knockdown resistance (Kdr) mutation. *J Vector Borne.* **52**: 95-98.
- Marcombe S., Farajollahi A., Healy S., Clark G., & Fonseca D. (2014). Insecticide resistance status of United States populations of *Aedes albopictus* and Mechanisms involved. *Plos One* **9**: 1-10.
- Martiradona, G., Silva, G., Molina de Fernández, D., Salcedo, L., Sánchez, V., Amaya, W & Berti, J. (2013). *Aedes (Stegomyia) albopictus*: (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) en Maracay-Aragua, Venezuela, aumento en su distribución geográfica. *Bol Mal Salud Amb.* **53**: 196-197.

- Mitchell C. S. (1995) Geographic Spread of *Aedes albopictus* and potential for involvement in arbovirus cycles in the Mediterranean basin. *J Vect Ecol.* **20**: 44-58.
- Molina de Fernández D., & Figueroa Acosta L. E. (2009). Resistencia metabólica a insecticidas organofosforados en *Anopheles aquasalis* Curry 1932, municipio Libertador, estado Sucre, Venezuela. *Biomédica.* **29**: 604-615
- Momi D. & Prafulla D. (2014). Status of insecticide resistance and detoxifying enzyme activity of *Aedes albopictus* population in Sonitpur district of Assam, India. *International J of Mosquito Research.* **1**: 35-41
- Moore C. G. & Mitchell C. J. (1997). *Aedes albopictus* in the United States: ten-year presence and public health implications. *Emerg Infect Diseases.* **3**: 329- 334.
- Navarro J., Zorrilla A. & Nelson M. (2009). Primer registro de *Aedes albopictus* (Skuse) en Venezuela. Importancia como vector de dengue y acciones a desarrollar. *Bol Mal Salud Amb.* **49**: 161-166.
- OMS (1993). *Técnicas entomológicas de campo para la lucha antipalúdica, parte I.* Guía del alumno. Organización Mundial de la Salud. Ginebra. pp.:9-77.
- OMS (1998). *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticide on treated surfaces.* WHO/CDC/MAL/98.12 Geneva, Switzerland.
- OPS (2013). Epidemiological alert. Chikungunya, fever, 9. (Disponible en línea: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid_23806&Itemid_999999&lang=en). (Consultado: 2015, Marzo 26).
- OPS & OMS (2015). *Actualización Epidemiológica, Infección por virus Zika.* [Disponible en línea: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=32023&lang=es]. (Consultado: 2015, Octubre 16).
- Pethuan S., Jirakanjanakit N., Saengtharatip S., Chareonviriyaphap T., Kaewpa D & Rongnoparut P. (2007). Biochemical studies of insecticide resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Tropical Biomedicine.* **24**: 7-15.
- Ponlawat A., Scott J. & Harrington L. (2005). Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* across Thailand. *J med Entomology.* **42**: 822-825.
- Pocquet N., Darriett F., Zumbo B., Milesi P., Thiria J., Bernard V., Toty C., Labbe P. & Chandre F. (2014). Insecticide resistance in disease vectors from Mayotte: an opportunity for integrated vector management. *Parasites & Vectors.* **7**: 299-309.
- Quinto C., Frontado H., Ledezma M., Polanco G., Montenegro J. & Naranjo J. (2013) *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) en los estados Monagas y Guarico, Venezuela. *Bol. Malariol Salud Amb.* **53**: 65-67.
- Ramírez R., Estrada Y. & Guzman H. (2012) Primer registro para el estado Aragua de *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894 (Diptera: Culicidae). *Bol. Malariol Salud Amb.* **52**: 307-309.
- Reiter P. (1998). *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988-1995: the shape of things to come?. *J of the Am Mosquito Control Association* **14**: 83-94.
- Rodríguez-Morales A. J. (2015). No era suficiente con el dengue y chikungunya: llegó también Zika. *Archivos de Medicina.* 11(2):e3. doi: 10.3823/1245
- Rodríguez M., Bisset J., Molina D., Soca A. (2000). Malathion resistance in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* after it is in *Aedes aegypti* control programs. *J. Amer. Mosq. Control. Assoc.* **16**: 324-330.
- Rodríguez M., Bisset J., Díaz C. Soca A. (2003). Cross resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* from Cuba induced by the selection with organophosphate malathion. *Rev Cubana Med Trop.* **55**: 105-111.
- Rodríguez M., Bisset J., Fernández D., Pérez O. (2004). Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de la

- esterasa A4 asociada con la resistencia a temefos
Rev Cubana Med Trop. **56**: 54-60.
- Rubio-Palis, Y., Estrada, Y., Guzmán, H., Caura, S.,
Sánchez, V. & Arias, L. (2015). Primer reporte de
Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse) (Diptera:
Culicidae) en el estado Bolívar e implicaciones
epidemiológicas. *Bol. Malarial Salud Amb.* **55**:
110-112.
- Saume F. (1992). *Introducción a la química y
toxicología de insecticidas*. Ed. Industria Gráfica
Integral C.A. Maracay, Venezuela.
- Robert R. Sokal, Miguel Lahoz León & F. James
Rohlf (1979). *Biometría: Principios y métodos
estadísticos en la investigación biológica*. Primera
edición española. Ediciones H. Blumes Rosario,
17- Madrid -5., 832p
- Somboon, P., Prapanthadara, L. y Suwonkerd, W.
(2003). Insecticide susceptibility tests of *Anopheles
minimus* s.l., *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*,
and *Culex quinquefasciatus* in northern Thailand.
Southeast Asian J of Trop Med and Public Health
34: 87-93.
- Thanispong K., Sathantriphop S. & Chareonviriyaphap
T. (2008). Insecticide resistance of *Aedes aegypti*
and *Culex quinquefasciatus* in Thailand. *J. Pestic.
Sci.* **33**: 351-356
- Vassena C. & Picollo M. (2000). Insecticide resistance
in Brazilian Triatom infestans and Venezuelan
Rhodnius prolixus. *Med Vet Entomol.* **14**: 51-55.
- Vontas J., Hejazi M., Hawkes N., Cosmidis N.,
Loukas M. & Hemingway J. (2002). Resistance-
associated point mutations of organophosphate
insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit
fly *Bactrocera oleae*. *Insect Molecular Biology.*
11: 329-336.

Recibido el 11/06/2015
Aceptado el 18/06/2016