

RESPUESTA A TEMEFOS EN *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) DE VENEZUELA

RESPONSE TO TEMEPHOS IN *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) FROM VENEZUELA

Leslie Álvarez G.^{1,4}, Jorge Suárez², Arelis Briceño¹, Adriana Flores S.³

¹Laboratorio de Bioquímica y Genética de Resistencia a Insecticidas. Núcleo Universitario “Rafael Rangel”, Universidad de los Andes, Venezuela. hleslieag@hotmail.com. ²Laboratorio de Biología de Lutzomyia e Insectario “Pablo Anduze”. Núcleo Universitario “Rafael Rangel”, Universidad de los Andes, Venezuela. suarez172005@gmail.com. ³Laboratorio de Fisiología y Toxicología de Insectos. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. adrflor@gmail.com.

⁴Autor de correspondencia.

Resumen

Temefos es el insecticida aplicado para el control de larvas de *Aedes aegypti* (L.), principal vector del dengue en Venezuela. Con la finalidad de conocer la respuesta a este larvicida organofosforado en tres poblaciones procedentes de Pampanito y Tres Esquinas en el estado Trujillo y San Juan en el estado Guárico de Venezuela, se llevaron a cabo bioensayos de susceptibilidad durante el 2013 siguiendo la metodología de la WHO (1981). Los resultados obtenidos muestran que las poblaciones estudiadas presentan baja resistencia al larvicida con valores para FRCL₅₀ y FRCL₉₀ inferiores a 5. Es importante que esta información sea considerada por los entes encargados de los programas de control de *Ae. aegypti* con la finalidad de evitar la evolución de la resistencia al único larvicida usado para el control del principal vector de dengue en Venezuela.

Palabras clave: larvicida, organofosforado, control, *Aedes aegypti*.

Abstract

Temephos is the insecticide applied to the control *Aedes aegypti*, the main vector of dengue in Venezuela. Larval bioassays were conducted by the WHO (1981) technique in 2013 to this larvicide in three populations of *Aedes aegypti* from Pampanito and Tres Esquinas in Trujillo state and San Juan in Guarico state, Venezuela. The results showed low resistance to the larvicide with values for FRCL₅₀ and FRCL₉₀ < than 5. It is important that this information be considered by the authorities responsible for control programs of *Ae. aegypti* with the purpose to prevent the evolution of resistance to this larvicide in Venezuela.

Keywords: larvicide, organophosphate, control, *Aedes aegypti*.

Recibido: 13/03/2014 - **Aprobado:** 19/09/2014

Introducción

El Dengue es una infección viral que ha surgido como un problema mundial desde 1950. En más de un tercio de la población que vive en zonas de riesgo en regiones tropicales y subtropicales, el virus del dengue es la principal causa de enfermedad. Según informa el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) para el 2013 más de 400 millones de personas padecieron de la enfermedad. El control de *Ae. aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) principal vector del dengue clásico y hemorrágico en Venezuela y en diferentes países de América Latina, se ha basado en la participación comunitaria, a través de la eliminación de criaderos potenciales para las formas inmaduras en el domicilio y peridomicilio y el saneamiento ambiental, sin embargo, esta acción por sí sola no es suficiente para suprimir las poblaciones, por lo que la aplicación de insecticidas químicos sigue siendo la principal herramienta para reducir la transmisión del dengue en la mayoría de los países afectados. Desde 1970, en Venezuela y otros países, los insecticidas químicos como el temefos (larvicida) y malatión (adulticida) han sido usados en los programas de control de *Ae. aegypti*, pero el uso masivo y extensivo han ejercido presión de selección eliminando paulatinamente tanto los individuos homocigotos susceptibles como los heterocigotos, trayendo como consecuencia la aparición de resistencia en *Ae. aegypti* y otros culicidos. Temefos (0,0,0'0'-tetrametil-0,0'-tiodifenil fosforotioato) es uno de los pocos insecticidas organofosforados registrados usados para el control de larvas de mosquitos, siendo el primer producto registrado el Abate® en 1965, (concentrado emulsionable para el control de larvas de mosquitos), fecha a partir de la cual se han desarrollado varias formulaciones granuladas. Temefos ha sido

usado por más de 30 años para el control de larvas de *Ae. aegypti* aplicado en tanques de agua y envases domésticos destinados al almacenamiento de agua consumible debido a la baja toxicidad observada en mamíferos. En el 2002, el uso de este larvicida comenzó a restringirse en los programas de control en salud pública debido a la resistencia reportada en diversos países de América Latina, entre ellos: Venezuela (Mazzarri y Georghiou 1995 ; Bisset et al., 2001, Alvarez et al., 2006), Cuba (Rodríguez et al, 1999), Brasil (Braga et al, 2004), Colombia (Cárdenas 2007, Fonseca 2008, Maestre et al., 2009), El Salvador (Bisset et al, 2009), y Argentina (Seccacini et al, 2008). Particularmente en Venezuela, desde 1995 *Ae. aegypti* ha desarrollado resistencia al temefos, tal como lo reportan Mazzarri y Georghiou en mosquitos de Coro en el estado Falcón y Maracay en el estado Aragua, asociando dicha resistencia con niveles sobre-expresados de alfa-esterasas A5. Posteriormente, Bisset et al (2001) encuentran resistencia en poblaciones de Apure con un valor de FR = 11.1 y altos niveles de alfa-esterasas. Álvarez et al., en el 2006 reportan resistencia moderada (FR= 6.4) en la localidad Paramito el estado Trujillo, así como, al evaluar la eficacia de la formulación 50% CE en cuatro poblaciones de *Ae. aegypti* del mismo estado encuentran en dos de ellas incipiente resistencia a la formulación (Álvarez et al., 2008), sugiriendo monitoreo continuo de estas y otras poblaciones del vector que se pretendan controlar con el organofosforado, con la finalidad de preservar la vida útil del producto. En la presente investigación nos propusimos monitorear la respuesta al temefos en poblaciones de *Ae. aegypti* procedentes de los estados Trujillo y Guárico para proporcionar información actualizada e importante para los programas de control del vector en las localidades evaluadas.

Metodología

Área de Estudio

El presente estudio comprende 3 poblaciones de campo de *Ae. aegypti* colectadas durante el 2013 en las localidades Pampanito (PPTO) y Tres Esquinas (TE) en el estado Trujillo y San Juan de los Morros (SJ) en el estado Guárico, Venezuela Figura 1.

Pampanito: corresponde a un asentamiento urbano ubicado en el municipio Pampanito, en las coordenadas 9°24'42" LN, 70°29'39" LO, en el centro del estado Trujillo, cerca de ciudades y poblaciones importantes como: Trujillo, Valera y Pampán a una altura entre 614 m.s.n.m. Su clima es del tipo tropical de montaña y tropical de altura con una temperatura variable que oscila entre 20°C y 30°C y una precipitación pluvial anual de 1200 mm. **Tres Esquinas:** es un asentamiento urbano localizado en las coordenadas 9°25'48" LN, 70°26'51" LO en el municipio Trujillo a 430 m.s.n.m. Su clima es del tipo tropical de montaña y tropical de altura con una temperatura entre 17°C y 24°C y una precipitación anual de 936 mm. **San Juan de los Morros:** asentamiento urbano ubicado a 9°54'11" LN, 67°20'41" LO a 429 m.s.n.m, es la capital del estado Guárico considerado como la puerta de entrada de los llanos centrales. Su clima es de tipo tropical lluvioso de sabana con temperaturas entre 24 y 30°C y una precipitación anual de 929 mm. La geografía de esta región es muy particular donde prevalecen montañas que contrastan con las llanuras del resto del estado.

Material Biológico

Estadios inmaduros fueron obtenidos de cualquier criadero temporal de *Ae. aegypti* y transportadas al Instituto Experimental "J W. Torrealba" de la Universidad de los Andes, Venezuela para el establecimiento de

las colonias. Las hembras fueron alimentadas con (*Gallus gallus domesticus*, Brisson) para la producción de huevos y obtención de generaciones parenterales las cuales fueron trasladadas al Laboratorio de Fisiología y Toxicología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México. Los huevos fueron colocados en contenedores de plástico con agua declorada proporcionándoles proteína de hígado en polvo al 50% en base de agua como fuente de alimento para los subsiguientes estadios larvarios. Al llegar al estadio de pupa se colocaron en envases de 250 ml dentro de jaulas (30 x 30 cm) hasta que emergieron los adultos. Los machos fueron alimentados con solución azucarada al 10% y las hembras con (*Rattus norvegicus* Berkenhout) para la producción de huevos. Envases con agua internamente revestidos con papel filtro fueron colocados dentro de la jaulas para la oviposición correspondiendo a la generación filial F1 con la cual se llevaron a cabo los bioensayos. Todas las poblaciones se mantuvieron a temperatura de 25°C±2°C y 70% ±2 de humedad relativa. Larvas de tercer estadio tardío de la F₁ de las poblaciones bajo estudio fueron usadas para los bioensayos, así como de la cepa de referencia New Orleans (NO) mantenida en el laboratorio sin exposición a insecticidas.

Bioensayos

Temefos calidad reactivo 97.5% de pureza (i.a Chem Service) fue diluido en 1ml de etanol para obtener una concentración stock de 100 µg/µl, a partir de la cual se prepararon diferentes diluciones con concentraciones que ocasionaron entre el 2% y el 98% de mortalidad. Los bioensayos fueron llevados a cabo siguiendo el protocolo de la WHO (1981), probando cinco a seis concentraciones y un control (sin insecticida) por triplicado con 20 larvas por repetición. Durante las primeras dos horas de exposición fueron realizadas lecturas cada 15 minutos y

luego de 2, 4 y 24 horas cuando se registró la mortalidad. Esta metodología se siguió con todas las poblaciones de campo y con la cepa de referencia NO. Los resultados obtenidos fueron analizados por log- Probit (Finney, 1971), empleando el programa Raymond (1985), para determinar la concentración letal cincuenta (CL_{50}), concentración letal noventa (CL_{90}), intervalos de confianza ($\alpha = 0.05$) y pendientes de la recta. En caso de obtener mortalidad en el testigo, se corrigió por Abbott (1925). Los valores fueron considerados significativamente diferentes si los intervalos de confianza al 95% no se traslapaban. El factor de resistencia cincuenta (FR_{50}) fue calculado dividiendo el valor de CL_{50} de cada población de campo entre el valor de CL_{50} de la cepa de referencia, de la misma forma se calculó el factor de resistencia noventa (FR_{90}) dividiendo los valores de la CL_{90} de las poblaciones de campo entre los de la cepa NO.

Resultados

Los valores de CL_{50} , CL_{90} , intervalos de confianza, pendiente de la recta y factores de resistencia para las poblaciones estudiadas se muestran en la Tabla 1. En esta se puede observar que los valores de CL_{50} oscilaron entre 0.009 $\mu\text{g/ml}$ y 0.011 $\mu\text{g/ml}$ no encontrándose diferencias significativa ($p < 0.05$) entre las poblaciones estudiadas, ya que los valores de los intervalos de confianza se traslapan. Al calcular los valores de $FRCL_{50}$ por comparación entre los valores de las poblaciones de campo y los de la cepa de referencia resultaron ser inferiores a 5, lo cual según criterio propuesto por Mazzarri y Georghiou (1995) indican que las poblaciones presentan baja resistencia al larvicida. Con respecto a las CL_{90} podemos observar valores comprendidos entre 0.017 $\mu\text{g/ml}$ y 0.018 $\mu\text{g/ml}$ no encontrándose diferencia significativa entre las poblaciones. Al calcular los $FRCL_{90}$ se encontraron

valores inferiores a 5 indicando mostrando baja resistencia al organofosforado. Las pendientes de las rectas de regresión fueron superiores en la poblaciones TE y SJ, 6.4 y 6.9 respectivamente, indicando que estas poblaciones responden de una forma homogénea al temefos, a diferencia de lo encontrado en PPTO y NO quienes mostraron una pendiente inferior.

Discusión

La resistencia a los insecticidas es una característica heredable, que se establece entre otros factores debido a la constante aplicación de insecticidas. La resistencia al temefos en *Ae. aegypti* ha sido demostrada en condiciones de laboratorio, luego de una intensa presión de selección (Rodríguez et al., 2002, Tikar et al., 2009). En Venezuela, a pesar de que desde los años 70 temefos granulado, es el único larvicida químico usado para el control de *Ae. aegypti*, pocas son las investigaciones que refieren resistencia a este insecticida. Si bien, en 1995, Mazzarri y Georghiou reportan poblaciones resistentes en localidades de Coro y Maracay al igual que Bisset et al (2001) en Aragua, Miranda y Táchira, los valores de los factores de resistencia (FR) fueron menores a 5 indicando baja resistencia y solo en una población del estado Apure se encontró alta resistencia ($FR < 10$) con sobre-expresión en los niveles de alfa-esterasas A4 (Bisset et al 2001), adicionalmente, una población de *Ae. aegypti* procedente del estado Trujillo mostró moderada resistencia al temefos ($FR 6.3$) (Álvarez et al., 2006). En el presente estudio se encontraron bajos valores para de $FRCL_{50}$ y $FRCL_{90}$ lo cual indica baja resistencia de las poblaciones evaluadas al temefos, lo cual pudiera deberse a la aplicación interrumpida del químico, tal como lo refiere Wirth y Georghiou (1999) quienes sugieren que la resistencia al temefos es inestable en ausencia de la presión de selección justificando la

efectividad larvicida mantenida en el tiempo, lo cual estaría sustentado por el hecho de que en Venezuela, los programas de control con temefos carecen de sustentabilidad y periodicidad lo cual favorece el retraso del desarrollo de la resistencia. Cabe mencionar que las poblaciones TE y PPTO para los años 2008 y 2010 mostraron baja resistencia al organofosforado (Álvarez et al., 2013) con valores para $FRCL_{50}$ inferiores a 5, siendo sujetas a monitoreo continuos a fin de detectar cambios en la respuesta a este larvicida y los resultados aquí mostrados informan que en estas poblaciones la resistencia al temefos no ha evolucionado, por lo que la conducta a seguir sería alternar su aplicación con el uso de otros controladores. Adicionalmente se recomienda seguir evaluando la respuesta de estas poblaciones al temefos por lo menos una vez año con la finalidad de identificar el momento oportuno para realizar cambios en los programas de control, ya que este estudio forma parte de un esfuerzo por monitorear la resistencia de *Ae. aegypti* a los insecticidas.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CDCHTA –ULA, Venezuela a través del proyecto NURR-C-571-13-03-13 y a la Universidad Autónoma de Nuevo León, México por el soporte financiamiento de la investigación.

Referencias bibliograficas:

Abbott W S. A method of computing the effectiveness of insecticide. *J.Econ Entomol.* 1925, 18: 265-267.

Álvarez L C, Briceño A, Oviedo M. Resistencia al temefos en poblaciones de *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) del occidente de Venezuela. *Revista Colombiana de Entomología.* 2006, 32 (2): 172-175.

Álvarez L C, Oviedo M, Briceño A. Evaluación de Temephos 50% CE sobre poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en Trujillo, Venezuela. *Revista Colombiana de Entomología.* 2008, 34(2): 188-191.

Álvarez L C, Ponce G, Oviedo M, López B., Flores, A E. Susceptibility status of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to temephos in Venezuela. *Pest. Manag. Sci.* doi: 10.1002/ps.3688, 2013.

Bisset J, Rodríguez M, Molina D, Soca L. Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Aedes aegypti*. *Rev. Cubana Med Trop.* 2001, 5: 37-43.

Bisset J, Rodríguez M, San Martín J, Romero J, Montoya R. Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health.* 2009, 26(3): 229-234.

Braga I A, Lima J B, Soares S, Valle D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the state of Río de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004, 99:199-203.

Cárdenas S R. Estado de la susceptibilidad a insecticidas de los principales vectores de malaria y dengue en áreas endémicas del Norte de Santander, Colombia. Tesis de Maestría. Trujillo, Venezuela: Universidad de los Andes. 2007, 110 p.

Finney D.J. *Probit analysis*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge. 1971, 58–96 p.

- Fonseca G I. Estatus de la resistencia a insecticidas de los vectores primarios de malaria y dengue en Antioquia, Chocó, Norte de Santander y Putumayo, Colombia. Tesis Doctoral. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 2008.
- Maestre R, Rey G, De La Salas J, Vergara C, Santacoloma L, Goenaga S, Carraquilla M. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) a temefos en Atlántico-Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*. 2009, 35 (2): 202-205.
- Mazzarri M B, Georghiou G P. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* (L) from Venezuela. *J. Am. Mosq Control Assoc*. 1995, 11(3):315-322.
- Raymond M. Presentation d'une programme d'analyse logprobit pour Microordinateur cahiers. *Orstrom Sér Ent Méd Parasitol*. 1985, 23:117-121 p.
- Rodríguez M M, Bisset J A, Milá L, Calvo E, Díaz C, Soca A. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en una cepa en *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba. *Rev. Cub. Med. Tropical*. 1999, 51(2):83-88.
- Rodríguez M M., Bisset J A., Ruiz M, Soca A. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) from Cuba. *Journal of Medical Entomology*. 2002, 39(6): 882-888.
- Seccacini E, Lucia A, Zerba E, Licastro S, Masuh H. *Aedes aegypti* resistance to temephos in Argentina. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2008, 24(4):608-609.
- Tikar S N, Arkaja Kumar, Prasad G, Shri P. Temephos-induced resistance in *Aedes aegypti* and its cross-resistance studies to certain insecticides from India. *Parasitol Res* DOI 10.1007/s00436-009-1362-8. 2009.
- Wirth M C, Georgiou G P. Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. *J. Amer. Mosq. Control. Assoc*. 1999, 15:315-320 p.
- World Health Organization (WHO). Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva. Switzerland, 1981 WHO/VBC/81.807.

Tabla 1. Toxicidad de temefos (CL_{50} , CL_{90}) y factores de resistencia ($FRCL_{50}$, $FRCL_{90}$) en larvas de *Aedes aegypti* de Venezuela.

Población	CL_{50} μg/ml	IC(95%)	¹ FRCL ₅₀	CL_{90} μg/ml	IC (95%)	² FRCL ₉₀	³ b (±SD)
New Orleans	0.007	0.006-0.008		0.017	0.014-0.021		3.4(0.36)
Pampanito	0.009	0.008-0.012	1.3	0.018	0.013-0.046	1.1	4.3(0.54)
Tres Esquinas	0.011	0.010-0.012	1.6	0.017	0.016-0.020	1.0	6.4 (0.78)
San Juan	0.011	0.011-0.012	1.6	0.018	0.016-0.020	1.1	6.9(0.75)

¹FRCL₅₀, Factor de Resistencia: CL_{50} población de campo/ CL_{50} cepa New Orleans

²FRCL₉₀, Factor de Resistencia: CL_{90} población de campo/ CL_{90} cepa New Orleans

³Pendiente de la recta de regresión Log-probit, entre paréntesis desviación estándar (DS)

IC: intervalos de confianza (95%)



Figura 1. Sitios de colecta de *Aedes aegypti* de Venezuela: 1. Tres Esquinas, 2. Pampanito (estado Trujillo) 3. San Juan (estado Guárico)