

MONITOREO DE LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN EL VECTOR DEL DENGUE, CHIKUNGUNYA Y ZIKA EN PUERTO VALLARTA, JALISCO, MÉXICO

Fabián Correa-Morales¹ , Felipe A. Dzul-Manzanilla², Herón Huerta³, Cassandra González-Acosta¹, Luis Hernández-Herrera², Joel Torres Leyva² y Wilbert Bibiano-Marín².

¹Programa de Enfermedades Transmitidas por Vector, Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades, C. P. 11800, Ciudad de México, México.

²Servicios Estatales de Salud de Guerrero, Avenida Ruffo Figueroa No. 6, Col. Burócratas, Chilpancingo, Guerrero. C. P. 39090, México.

³Laboratorio de Entomología, Instituto de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas, C. P. 01480, Ciudad de México, México

 Autor de correspondencia: fabiancorrea@msn.com

RESUMEN. La resistencia a insecticidas es uno de los principales obstáculos para la exitosa prevención y control del Dengue, Chikungunya y Zika. En México, se han detectado incrementos de las frecuencias de los genes de resistencia asociadas con el uso de la permetrina. En respuesta a la amplia distribución de resistencia en México, la Secretaría de Salud Federal, certificó ocho unidades de bioensayos para implementar una red de monitoreo de la resistencia, usando el método de botellas impregnadas del CDC y las dosis diagnósticas. Con finalidad de diagnosticar la resistencia de las poblaciones de *Aedes aegypti* de Puerto Vallarta, se realizaron bioensayos usando las dosis diagnósticas y las razones de resistencia. Los resultados de las dosis diagnósticas indican resistencia a la Permetrina y los datos de las razones de resistencia indican susceptibilidad a los insecticidas estudiados.

Palabras clave *Aedes aegypti*, dosis diagnósticas, razón de resistencia.

Monitoring Insecticide Resistance in the vector of Dengue, Chikungunya and Zika in Puerto Vallarta, Jalisco, México

ABSTRACT. Insecticide resistance is one of the main obstacles to successful prevention and control of dengue, Chikungunya and Zika. In Mexico, it has been detected increases in the genes frequencies resistance associated with the using of permethrin. In response to the widespread distribution of resistance in Mexico, the federal ministry of health, certified 8 units of bioassays to implement a monitoring network of resistance, using the CDC bottles bioassay and diagnostic doses. In order to diagnose the resistance of populations of *Aedes aegypti* from Puerto Vallarta, bioassays were run using diagnostic doses and resistance ratio. The result of diagnostic doses indicate resistance to Permethrin and data of resistance ratio show susceptibility to insecticides studied.

Keywords: *Aedes aegypti*, diagnostic dose, resistance ratio.

INTRODUCCIÓN

El mosquito *Aedes aegypti* es el vector de Dengue, Chikungunya y Zika en México y la resistencia a los insecticidas es el principal obstáculo para la exitosa prevención y control de estas enfermedades. La resistencia a los insecticidas es el término usado para describir la situación en la que los vectores no mueren con la dosis estándar de los insecticidas (ya no son susceptibles al insecticida) o evitan entrar en contacto con los insecticidas (WHO, 2012). En otras palabras, es el desarrollo de la capacidad de tolerar las dosis de insecticidas que resultarían letales para la mayoría de los individuos de una población normal de la misma especie (WHO, 1957).

La presión de selección ejercida por los piretroides (principalmente Permetrina) en las poblaciones de este vector, ha favorecido el desarrollo de la resistencia en México (Saavedra-

Rodríguez *et al.*, 2007; García *et al.*, 2009; Siller *et al.*, 2011; Barbosa *et al.*, 2011; Aponte-Hincapie *et al.*, 2013, Flores *et al.*, 2013; López *et al.*, 2014, Flores-Suárez *et al.*, 2016), incluso los datos de la evolución de la resistencia de México han sido utilizados por la Organización Mundial de la Salud para ilustrar la resistencia a insecticidas en Anofelinos (WHO, 2012). En este contexto existe un renovado interés en monitorear la resistencia a insecticidas y determinar las moléculas y formulaciones más adecuadas para el control de los vectores en México (DOF, 2015). Para llevar a cabo esta importante tarea la Secretaría de Salud Federal a través de Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades en colaboración con los Estados, certificaron ocho Unidades de Bioensayos para implementar una red de monitoreo de la resistencia con las dosis diagnósticas y el método de botellas impregnadas del Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2010).

El objetivo del presente es reportar los resultados de la red de monitoreo de resistencia a insecticidas en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Puerto Vallarta, Jalisco, México.

MATERIALES Y MÉTODO

En los bioensayos se usaron mosquitos hembras F1 de tres a cinco días de edad. Las colonias fueron obtenidas de huevos de muestras de ovitrampas instaladas en Puerto Vallarta, Jalisco. Adicionalmente a las muestras de poblaciones locales de *Ae. aegypti* de Puerto Vallarta, se utilizó una cepa susceptible (New Orleans), la cual fue originalmente colectada en New Orleans, USA y proporcionada por el InDre.

Dosis Diagnósticas. 100 mosquitos hembras (25 por botellas, cuatro botellas) fueron expuestos a cada dosis diagnóstica (DD) y observados durante el tiempo de diagnóstico (TD) hasta dos horas de exposición. Las DD y TD que se usaron son mostrados en el cuadro 1. Los insecticidas grado técnico fueron proporcionado por ChemService (West Chester, PA) y las preparaciones fueron realizadas en el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Guerrero. Adicionalmente, se expusieron 25 mosquitos en una botella impregnada con solo acetona, utilizándose esta como control negativo de la prueba. Los bioensayos y las preparaciones fueron replicados tres veces.

Cuadro 1. Dosis diagnósticas y tiempo diagnóstico (minutos) de insecticidas para mosquitos del género *Aedes*.

Insecticida	µg/ml	Tiempo	Grupo químico	Referencia
Bendiocarb	12.5	30	Carbamato	DCD 2010 y OMS 2013
Malatión	50	30	Organofosforado	
Permetrina	15	30	Piretroide tipo I	
AlfaCipermetrina	10	30	Piretroide tipo II	
Lambdacialotrina	10	30	Piretroide tipo II	
Etofenprox	5	40	Pseudopiretroide	Dzul <i>et al.</i> , 2014.
Propoxur	3	30	Carbamato	Dzul <i>et al.</i> , 2014.
Clorpirifos	85	30	Organofosforado	López <i>et al.</i> , 2014.
Propoxur	12.5	30	Carbamato	Fonseca, 2008.

El efecto de derribo (Knockdown = KD) fue registrado cada 10 minutos hasta el 100 % de KD o 120 minutos. Posteriormente, los mosquitos fueron transferidos a vasos de observación y alimentados con solución azucarada al 10 %. A las 24 horas se registró la mortalidad aguda, considerando como mosquitos muertos: 1) mosquitos caídos en el fondo del recipiente, 2) mosquitos con apariencia anormal (alas abiertas, tarsos torcidos), 3) mosquitos con dificultades para volar. Los criterios para interpretar la mortalidad aguda fueron: 98-100 % de mortalidad indica susceptibilidad, 90-98 % de mortalidad sugiere resistencia y mortalidad < 90 % indica resistencia

(OMS, 2013). Con los datos binarios (1 = muerto y 0 = vivo) se realizó un análisis de Kaplan-Meier con Stata 13 (StataCorp LP).

Razón de Resistencia (RR). Con la finalidad de confirmar o descartar los resultados observados con las DD y TD, se seleccionó un piretroide tipo I (Permetrina), un piretroide tipo II (Lambdacialotrina), el pseudopiretoide Etofenprox, un carbamato (Bendiocarb) y un organofosforado (Clorpirifos) para determinar la RR. Se usaron de cinco a ocho dosis de cada insecticida que proporcionan mortalidades entre 0 a 100 %, para estimar la LD₅₀ en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Puerto Vallarta y en la cepa New Orleans. Las preparaciones y el estudio fueron replicados tres veces.

Para seleccionar adecuadamente el modelo que describa o se ajuste correctamente a los datos de cada insecticida/localidad y se realice una correcta estimación de la LD₅₀, se compararon tres modelos de regresión (logit, probit y cloglog) con la variable independiente sin transformar (dosis) y la variable transformada (logaritmo de la dosis). Debido a que estos modelos no son anidados, se usaron los valores de AIC (Akaike Information Criterion), el valor de deviance y el coeficiente de correlación de Pearson (*r*) para seleccionar el modelo final para cada insecticida por localidad. Finalmente, se calculó la LD₅₀ para cada modelo y RR por cada insecticida. La RR fue calculada por dividir la LD₅₀ de las poblaciones de Puerto Vallarta entre la LD₅₀ de la cepa New Orleans. Los criterios utilizados para interpretar las RR son: RR > 10 indican altos niveles de resistencia, RR < 5 indican bajos niveles de resistencia (susceptibilidad) y RR entre > 5 y < 10 indican moderados niveles de resistencia (Mazzari y Georghiou., 1995). Los análisis fueron realizados en RStudio ver. 0.99.878 (<http://www.rstudio.com>) and R ver 3.2.3 (The R Foundation for Statistical Computing, <http://cran.r-project.org>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos de derribo y la mortalidad aguda con las dosis diagnósticas y tiempos diagnósticos sugieren susceptibilidad a los insecticidas estudiados (Figs. 1 y 2), excepto al insecticida Permetrina donde se observó que el 5% de los mosquitos no son derribados después de una hora y la mortalidad aguda a las 24 horas fue del 89 % (Fig. 2).

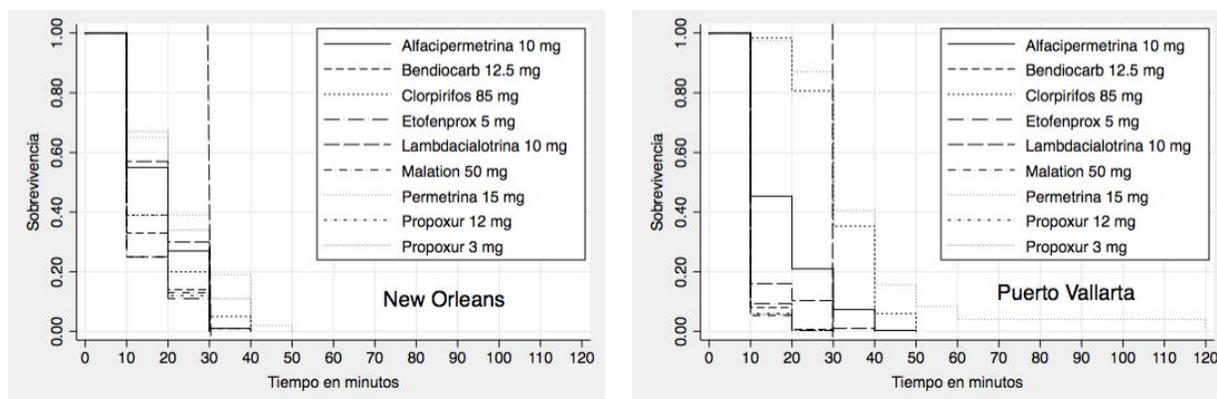


Figura 1. Análisis de Kaplan-Meier para la curvas de respuesta de *Ae. aegypti* de New Orleans y Puerto Vallarta.

Diez modelos se seleccionaron de setenta, siete modelos se ajustaron al link probit, tres al link cloglog y en un solo modelo fue necesario usar el logaritmo de la dosis (cuadro 2). Los resultados de las RR y el ajuste de las curvas de respuesta son proporcionados en el cuadro 3 y la figura 3. Las RR fueron menores de cinco, indicando susceptibilidad a los tres grupos toxicológicos usados para el control del Dengue, Chikungunya y Zika.

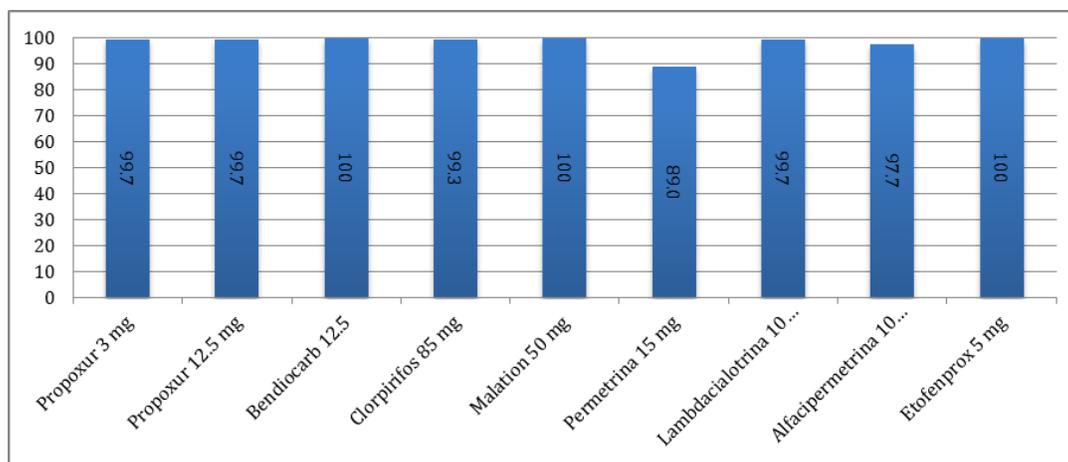


Figura 2. Mortalidad aguda de *Ae. aegypti* de Puerto Vallarta.

Cuadro 2. Comparación de los links logit, probit y cloglog con la dosis y el logaritmo de la dosis de los insecticidas de las localidades de New Orleans y Puerto Vallarta.

Insecticida	Localidad	Link	Dosis			log(Dosis)		
			AIC	<i>r</i>	Deviance	AIC	<i>r</i>	Deviance
Bendiocarb	New Orleans	logit	102.793	0.99	66.833	186.577	0.97	150.617
		probit	90.181	0.992	54.221	221.418	0.964	185.458
		cloglog	99.851	0.988	63.891	118.951	0.986	82.991
	Puerto Vallarta	logit	112.41	0.99	79.705	163.457	0.976	130.752
		probit	98.293	0.992	65.588	176.266	0.972	143.56
		cloglog	108.234	0.988	75.529	106.151	0.989	73.446
Clorpirifos	New Orleans	logit	92.019	0.99	61.256	154.446	0.972	123.682
		probit	80.041	0.992	49.278	172.786	0.969	142.023
		cloglog	80.211	0.99	49.447	98.357	0.986	67.593
	Puerto Vallarta	logit	91.45	0.99	61.553	125.842	0.974	95.944
		probit	78.76	0.991	48.863	127.633	0.973	97.735
		cloglog	84.032	0.991	54.134	79.894	0.988	49.997
Etofenprox	New Orleans	logit	99.766	0.989	63.534	167.257	0.974	131.025
		probit	87.027	0.991	50.795	185.37	0.972	149.138
		cloglog	89.17	0.989	52.938	108.1	0.987	71.868
	Puerto Vallarta	logit	125.579	0.981	90.049	190.859	0.965	155.329
		probit	112.652	0.984	77.122	212.218	0.962	176.688
		cloglog	103.651	0.984	68.121	136.952	0.979	101.422
Lambdacialotrina	New Orleans	logit	71.506	0.993	40.358	179.606	0.971	148.458
		probit	60.616	0.995	29.468	222.133	0.963	190.984
		cloglog	66.582	0.992	35.434	109.755	0.988	78.607
	Puerto Vallarta	logit	91.341	0.99	64.289	174.861	0.965	147.809
		probit	80.561	0.991	53.508	186.115	0.959	159.063
		cloglog	71.305	0.994	44.253	106.32	0.983	79.267
Permetrina	New Orleans	logit	70.691	0.997	31.803	254.422	0.971	215.535
		probit	61.214	0.998	22.327	341.004	0.960	302.117
		cloglog	88.784	0.991	49.897	168.272	0.987	129.385
	Puerto Vallarta	logit	109.587	0.99	71.293	113.919	0.976	75.626
		probit	98.086	0.991	59.793	146.414	0.962	108.12
		cloglog	176.829	0.971	138.535	78.036	0.989	39.743

*AIC = Akaike Information Criterion, *r* = Coeficiente de Correlación de Pearson, log (Dosis) = Logaritmo de la Dosis.

Es importante hacer énfasis en la diferencia de resultados entre los bioensayos de las dosis diagnósticas y el bioensayo de las razones de resistencia, con el primero se observa resistencia de *Ae. aegypti* a la Permetrina y con el segundo no se observa resistencia a alguno de los insecticidas estudiados. Esta diferencia recalca la importancia de realizar paralelamente ambos bioensayos para comprobar o descartar la resistencia a un específico insecticida (Dzul-Manzanilla *et al.*, 2014) o en su defecto usar el bioensayo de dosis diagnóstica como prueba tamiz para el diagnóstico de la resistencia a insecticidas. Aunque, los bioensayos de las razones de resistencia son superiores a los bioensayos de dosis diagnósticas, se requiere complementar ambos estudios con pruebas bioquímicas, metabólicas y moleculares.

Cuadro 3. LD₅₀ (CI95%) y RR de las poblaciones de *Ae. aegypti* de Puerto Vallarta, Jalisco.

Insecticida	Cepa	n	LD ₅₀	CI95%	Formula	Valor de p	RR
Permetrina	NO	2400	6.32	5.9-7.1	$-1.758 + 0.278 \text{ dosis}$	< 0.01	1
	PV	2400	7.33	4.8-11.9	$0.064 + 3.295 \log \text{ dosis}$	< 0.01	1.16
Lambdacialotrina	NO	1800	4.28	3.6-6.4	$-2.952 + 0.483 \text{ dosis}$	< 0.01	1
	PV	1800	5.35	4.5-6.4	$-2.952 + 0.483 \text{ dosis}$	< 0.01	1.25
Etofenprox	NO	2100	2.37	2.1-2.7	$-1.670 + 0.704 \text{ dosis}$	< 0.01	1
	PV	2100	2.95	2.5-3.4	$-2.841 + 0.838 \text{ dosis}$	< 0.01	1.24
Bendiocarb	NO	2100	5.81	5.1-6.6	$-1.631 + 0.281 \text{ dosis}$	< 0.01	1
	PV	2100	6.32	5.5-7.2	$-1.815 + 0.287 \text{ dosis}$	< 0.01	1.09
Clorpirifos	NO	1800	37.8	32.6-43.6	$-1.584 + 0.042 \text{ dosis}$	< 0.01	1
	PV	1800	43.8	37.9-50.4	$-1.889 + 0.043 \text{ dosis}$	< 0.01	1.16

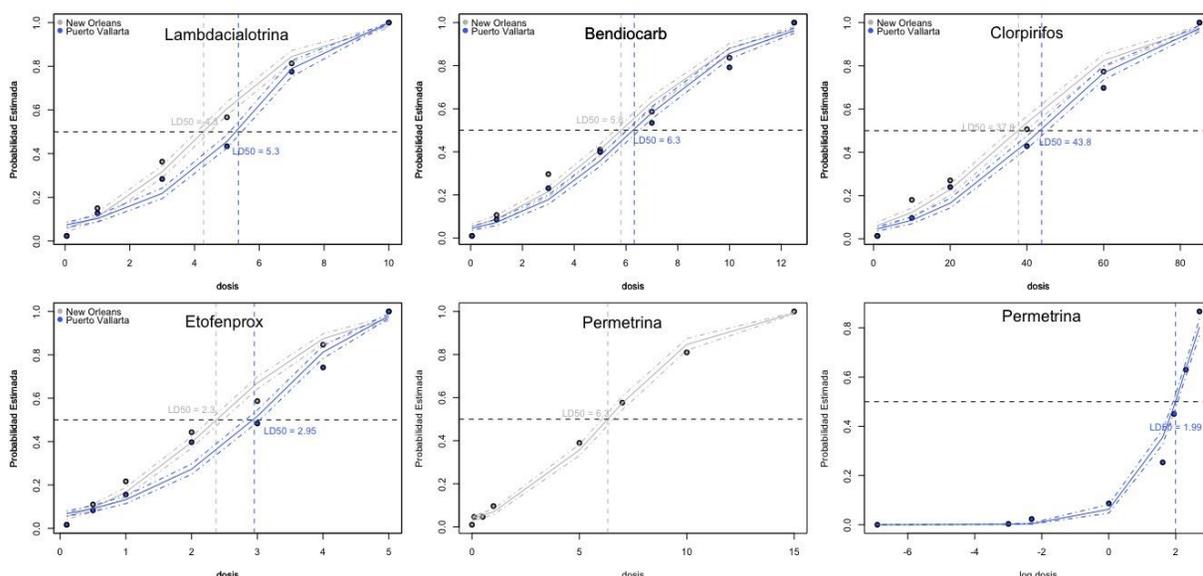


Figura 3. Curvas de respuesta de los bioensayos de dosis-respuesta ajustadas de New Orleans (grises) y Puerto Vallarta (líneas azules) por insecticida.

CONCLUSIÓN

Los resultados de las dosis diagnósticas y las razones de resistencia indican que las poblaciones de *Ae. aegypti* de Puerto Vallarta no presentan resistencia al Bendiocarb, Propoxur, Clorpirifos, Malatión, Permetrina, Lambdacialotrina, Alfacipermetrina y Etofenprox. Basados en los resultados, se sugiere continuar el monitoreo de la resistencia a insecticidas, y complementarlo con

las pruebas bioquímicas, metabólicas y moleculares, y diseñar un plan estratégico de la resistencia para prevenir la aparición de resistencia en los grupos químicos usados para el control vectorial.

Agradecimientos.

A la Secretaría de Salud del estado de Jalisco por proporcionar el material biológico y a la Secretaría de Salud del estado de Guerrero por realizar los bioensayos en las instalaciones de la Unidad de Bioensayos de Acapulco.

Literatura citada

- Aponte-Hincapie, A., Penilla-Navarro, P., Dzul-Manzanilla, F., Che-Mendoza, A., López, A. D., Solís, F., Manrique-Saide, P., Ranson, H., Lenhart, A., McCall, P. J., and A. D. Rodríguez. 2013. The pyrethroid resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* from Guerrero state, Mexico. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107(2): 226–234.
- Barbosa, S., Black IV, W. C., and I. Hastings. 2011. Challenges in estimating insecticide selection pressures from mosquito field data. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5(11): 1–11. doi.org/10.1371/journal.pntd.0001387.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2010. *Guidelines for Evaluation Insecticide Resistance in Vectors using the CDC Bottle Bioassay*. Atlanta, Georgia 30333, USA. 56 p.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2015. *Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010, para la Vigilancia Epidemiológica, Prevención y Control de las Enfermedades Transmitidas por Vector*. DCCXXXIX, 12: 56–104.
- Dzul-Manzanilla, F. D., Gutiérrez-Castro, C., Hernández-Herrera, L., Ibarra-López, J., Bibiano-Marín, W., and L. López-Damián. 2014. Las poblaciones de *Aedes aegypti* de Acapulco, Guerrero son resistentes a piretroides tipo I, pero susceptibles a piretroides tipo II y Pseudopiretroide. *Entomología mexicana*, 2: 898–903.
- Fonseca-González, I. 2008. *Estatus de la Resistencia a Insecticidas de los Vectores Primarios de Malaria y Dengue en Antioquia, Choco, Norte De Santander y Putumayo, Colombia*. PhD Thesis. Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Instituto de Biología. Medellín, Colombia. 203 p.
- García, G. P., Flores, A. E., Fernández-Salas, I., Saavedra-Rodríguez, K., Reyes-Solís, G., Lozano-Fuentes, S., Guillermo Bond, J., Casas-Martínez, M., Ramsey, J. M., García-Rejón, J., Domínguez-Galera, M., Ranson, H., Hemingway, J., Eisen, L., and W. C. Black IV. 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in México. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(10): 1–10. doi.org/10.1371/journal.pntd.0000531.
- López, B., Ponce, G., González, J. A., Gutiérrez, S. M., Villanueva, O. K., González, G., Bobadilla, C., Rodríguez, I. P., Black IV, W. C., and A. E. Flores. 2014. Susceptibility to Chlorpyrifos in pyrethroid-resistance populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from México. *Journal of Medical Entomology*, 51(3): 644–649.
- Flores, A. E., Ponce, G., Silva, B. G., Gutiérrez, S. M., Bobadilla, C., López, B., Mercado, R., and W. C. Black IV. 2013. Wide spread across resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Veracruz state México. *Journal of Economical Entomology*, 106(2): 959–969.
- Flores-Suárez, A. E., Ponce-García, G., López-Monroy, B., Villanueva-Segura, O. K., Rodríguez-Sánchez, I. P., Arredondo-Jiménez, J. I., and P. Manrique-Saide. 2016. Current status of the insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from México. Pp. 99–109. In: Stanislav, T. (Ed.). *Insecticide Resistance*. InTech Publisher.
- Mazzari, C. A., and G. P. Georghiuo. 1995. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field population of *Aedes aegypti* from Venezuela. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 11(3): 315–322.

- Saavedra-Rodríguez, K., Strode, C., Flores-Suárez, A., Fernández-Salas, I., Ranson, H., Hemingway, J., and W. C. Black IV. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, 16(6): 785–798.
- Siller, Q., Ponce, G., Lozano, S., and A. E. Flores. 2011. Update on the frequency of Ile1016 mutation in voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* in México. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 27(4): 357–362.
- World Health Organization (WHO). 1975. *Expert committee on insecticides*. WHO Technical Report Series No. 125. Geneva, Switzerland. 32 p.
- World Health Organization (WHO). 2012. *Global plan for insecticide resistance management in Malaria vectors (GPIRM)*. Geneva, Switzerland. 131 p.
- World Health Organization (WHO). 2013. *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes*. Geneva, Switzerland. 31 p.