

EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS EN *Aedes aegypti* CAPTURADOS EN EL MUNICIPIO DE SINCELEJO, DEPARTAMENTO DE SUCRE, COLOMBIA.

YOSED PATRICIA ANAYA CHÁVEZ.

Bsc. SULJEY COCHERO BUSTAMANTE

Directora

M.Sc. PEDRO BLANCO TUIRÁN

Codirector

UNIVERSIDAD DE SUCRE

FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIA

PROGRAMA DE BIOLOGÍA CON ENFASIS EN BIOTECNOLOGÍA

SINCELEJO, 2008.

EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS EN *Aedes aegypti* CAPTURADOS EN EL MUNICIPIO DE SINCELEJO, DEPARTAMENTO DE SUCRE, COLOMBIA.

YOSED PATRICIA ANAYA CHÁVEZ.

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGO CON ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGÍA.

Bsc. SULJEY COCHERO BUSTAMANTE

Directora

M.Sc. PEDRO BLANCO TUIRÁN

Codirector

UNIVERSIDAD DE SUCRE

FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIA

PROGRAMA DE BIOLOGÍA CON ENFASIS EN BIOTECNOLOGÍA

SINCELEJO, 2008.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Primer Jurado

Segundo Jurado

Tercer Jurado

CIUDAD Y FECHA: _____

DEDICATORIA

A mi Dios, quien es la fuente de la sabiduría, el conocimiento y la inteligencia.

A mis padres y hermano por su amor, esfuerzos y sacrificios, por enseñarme a vivir sabiamente y a dar siempre lo mejor de mí.

A Suljey Cochero Bustamante por ser la luz enviada del cielo en el momento justo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, quien me ha permitido realizar esta investigación con ayuda de personas tan increíbles que me han ofrecido su amor y colaboración. Por ser la fortaleza de mi vida en los momentos difíciles y por enseñarme a confiar en que nada hay imposible para él.

A mis padres por su gran amor y apoyo incondicional en todo tiempo, por creer en mí y motivarme a luchar por mis sueños siempre.

A Suljey Cochero Bustamante por su ayuda incondicional en la realización de este proyecto, además por compartir su sabiduría de vida y sus conocimientos en el área de la Entomología Médica.

Al Bacteriólogo Jhon Jairo Gonzales por su valiosa asesoría en la realización de este trabajo.

A la Doctora Idalyd Fonseca y estudiante Nelson Grisales agradezco su asesoría en un momento clave en la realización de esta investigación. Además agradezco su calidez y su valioso tiempo.

Al MD, MCs Pedro Blanco Tuirán por aceptar la codirección de este trabajo, por su tiempo y sus consejos académicos.

A la Universidad de Sucre, por la formación académica recibida.

Mi gratitud incondicional a mis amigos y a todos aquellos que de una u otra forma han colaborado en la realización de esta tesis.

Este proyecto de investigación fue financiado por el Departamento Administrativo de Seguridad en Salud de Sucre DASSSALUD. Por ello mis más sinceros agradecimientos.

**únicamente los autores son los responsables de las ideas expuestas en este trabajo
(artículo 12, resolución 02 – 03).**

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABLAS	XII
LISTA DE IMAGENES	XIII
LISTA DE ANEXOS	XIV
RESUMEN	XV
ABSTRACT.....	XVI
INTRODUCCIÓN.....	17
2. ESTADO DEL ARTE.....	20
2.1. AGENTE ETIOLÓGICO.....	20
2.2 EL VECTOR.....	21
2.3 ESTRATÉGIAS PARA EL CONTROL DEL VECTOR <i>Aedes Aegypti</i>	25
2.3.1. MODO DE ACCIÓN DE LOS INSECTICIDAS.	26
2.3.1.1 INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS Y CARBAMATOS:.....	26
2.3.1.2 INSECTICIDAS PIRETROIDES:	26
2.4. RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN INSECTOS VECTORES.	27
2.4.1 TIPOS DE RESISTENCIA.	29
2.4.1.1 RESISTENCIA MÚLTIPLE:	29
2.4.1.2 RESISTENCIA CRUZADA:	29
2.5 MECANISMOS DE RESISTENCIA EN INSECTOS.....	30
2.5.1 RESISTENCIA POR ALTERACIONES EN EL SITIO DE ACCIÓN DEL	31
INSECTICIDA:.....	31
2.5.1.1 ACETILCOLINESTERASA INSENSIBLE.	31
2.5.1.2 ALTERACIONES EN EL CANAL DE SODIO DEPENDIENTE DE VOLTAJE.	31
.....	31
2.5.2 RESISTENCIA METABÓLICA.	32

2.5.2.1 CARBOXILESTERASAS.....	32
2.5.2.2 OXIDASAS DE FUNCIÓN MÚLTIPLE.....	33
2.5.2.3 GLUTATIÓN-S-TRANSFERASAS.....	34
2.6 BIOENSAYOS DE RESISTENCIA.....	36
3. OBJETIVOS	37
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	37
4. METODOLOGÍA.....	38
4.1 ÁREA DE ESTUDIO.....	38
4.2 RECOLECCIÓN DE LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i>	38
4.3 MANTENIMIENTO DE LAS COLONIAS DE <i>Aedes aegypti</i>	39
4.4 BIOENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD/RESISTENCIA A TEMEFOS EN LARVAS.	40
4.5 BIOENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD/RESISTENCIA EN ADULTOS.....	42
4.6 ENSAYOS BIOQUIMICOS.....	43
4.6.1 Detección de Esterasas no Específicas.....	43
4.6.2 Detección de Monoxigenasas (Citocromo P ⁴⁵⁰).....	44
4.6.3 Detección de Acetilcolinesterasa Insensible.....	44
4.7 CRITERIOS DE EVALUACIÓN.....	44
5. RESULTADOS.....	46
5.1 IDENTIFICACIÓN DE LARVAS Y ADULTOS DE <i>Aedes aegypti</i>	46
5.2 BIOENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD/RESISTENCIA A TEMEFOS EN LARVAS.....	49
5.3 BIOENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD/RESISTENCIA EN ADULTOS.....	49
5.4 ENSAYOS BIOQUIMICOS.....	52
6. DISCUSIÓN.....	60
7. CONCLUSIONES.....	64
8. RECOMENDACIONES.....	66

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 67
10. ANEXOS 80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico de <i>Aedes aegypti</i> .	24
Figura 2: Sitios de Acción de Insecticidas.	27
Figura 3. Resistencia Cruzada a Insecticidas.	30
Figura 4: Amplicon de una cepa de <i>Culex quinquefasciatus</i> PellRR resistente a Organofosforados.	33
Figura 5: Porcentaje de Mortalidad en Adultos de <i>Aedes aegypti</i> de la cepa Cortijo expuestos a papeles impregnados con insecticidas.	51
Figura 6: Porcentaje de Mortalidad en Adultos de <i>Aedes aegypti</i> de la cepa Botero expuestos a papeles impregnados con insecticidas.	52
Figura 7. Valores de absorbancia para esterasas en una cepa de <i>Aedes aegypti</i> del sector El Cortijo.	54
Figura 8. Valores de absorbancia para esterasas de una cepa de <i>Aedes aegypti</i> del Sector Botero.	55
Figura 9. Valores de absorbancia para Oxidasas de Función Mixta en una cepa de <i>Aedes aegypti</i> del Sector El Cortijo.	56
Figura 10. Valores de absorbancia para Oxidasas de Función Mixta en una cepa de <i>Aedes aegypti</i> del Sector Botero.	57
Figura 11. Valores de absorbancia para Acetilcolinesterasa Inhibida en una cepa de <i>Aedes aegypti</i> del sector El Cortijo.	58

Figura 12. Valores de absorbancia para Acetilcolinesterasa Inhibida en una cepa de *Aedes aegypti* del sector Botero.

59

LISTA DE TABLAS

Tabla Nº 1. Principales Mecanismos de Resistencia a Insecticidas.	35
Tabla Nº 2. Bioensayos en Larvas de <i>Aedes aegypti</i> evaluando la dosis diagnóstica (0.012mg/mL) de Temefos.	49
Tabla Nº3. Estado de susceptibilidad a insecticidas organofosforados, al organoclorado DDT y piretroides en adultos de <i>Aedes aegypti</i> del sector El Cortijo.	50
Tabla Nº4. Estado de susceptibilidad a insecticidas organofosforados, al organoclorado DDT y piretroides en adultos de <i>Aedes aegypti</i> del sector Botero.	50
Tabla Nº 5. Valores de absorbancia para β esterasas en la cepa El Cortijo.	54
Tabla Nº 6. Valores de absorbancia para β esterasas en la cepa Botero.	55
Tabla Nº7. Valores de absorbancia para Citocromo P450 en la cepa El Cortijo.	56
Tabla Nº8. Valores de absorbancia para Citocromo P450 en la cepa Botero.	57
Tabla Nº9. Valores de absorbancia para AChE Insensible en la cepa El Cortijo.	58
Tabla Nº10. Valores de absorbancia para AChE Insensible en la cepa Botero.	59

LISTA DE IMAGENES

Imagen 1. Virus Del Dengue.	21
Imagen 2: (a) <i>Aedes aegypti</i> , mosquito trasmisor del dengue; b) Cabeza y Tórax de <i>Aedes aegypti</i> .	23
Imagen 3. Recolección de larvas de <i>Aedes Aegypti</i> .	39
Imagen 4. Mantenimiento de las larvas y adultos de <i>Ae. Aegypti</i> en el Laboratorio de Entomología.	40
Imagen 5. Bioensayos de Susceptibilidad en Larvas de <i>Aedes . Aegypti</i> .	41
Imagen 6. Bioensayos de susceptibilidad en Adultos de <i>Aedes Aegypti</i> .	42
Imagen 7. Identificación de larvas de <i>Aedes aegypti</i> en laboratorio.	48

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Formato de registro de resultados de las pruebas de susceptibilidad en larvas de <i>aedes aegypti</i> a insecticidas.	81
Anexo 2. Formato de registro de resultados de las pruebas de susceptibilidad en adultos de <i>aedes aegypti</i> a insecticidas.	82
Anexo 3. Formato de registro de resultados de las pruebas de susceptibilidad en adultos de <i>aedes aegypti</i> a insecticidas piretroides.	83
Anexo 4. Número de casas a inspeccionar en una localidad. vigilancia entomológica de <i>aedes aegypti</i> .	84

RESUMEN

En el contexto del manejo integrado de vectores, el control químico continua siendo una estrategia importante, si su uso es vigilado periódicamente. Debido a la importancia del uso de insecticidas en los programas de control de *Aedes aegypti*, este estudio se propuso evaluar el estado de susceptibilidad a los insecticidas Malatión, Fenitrotión, Deltametrina, Lambda-cyhalotrina, DDT y Temefós en dos poblaciones de *Aedes aegypti* de la ciudad de Sincelejo, utilizando la metodología establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Además se determinó la actividad de las enzimas esterases no específicas (β esterases), oxidasas de función múltiple (Citocromo P⁴⁵⁰) y acetilcolinesterasa insensible para confirmar los resultados obtenidos en los bioensayos.

Se detectaron altos niveles de resistencia al larvicida Temefós, al DDT y se confirmó la susceptibilidad a Malatión, Fenitrotión y a los piretroides en las poblaciones del mosquito *Aedes Aegypti* estudiadas.

En la población de mosquitos del sector Botero se encontraron niveles elevados de enzimas β esterases y baja actividad de enzimas citocromo P⁴⁵⁰ y acetilcolinesterasa insensible. La población del sector El Corijo mostró baja actividad para todas las enzimas estudiadas.

Los resultados sugieren una asociación entre las enzimas β esterases como posible mecanismo de la resistencia a Temefós en la población del barrio Botero y la utilización de otro mecanismo de resistencia a Temefós en la población de mosquitos del sector El Cortijo, posiblemente asociado a las enzimas glutatión S transferasas.

Es importante continuar con el monitoreo de la resistencia a insecticidas para asegurar la efectividad de los programas de control vectorial y la protección de la salud de la población.

ABSTRACT

In the context of the integrated vector management, chemical control continues to be an important strategy if it is used in a rational and controlled way. The objective of the present work was to determine the susceptibility to Malathion, Fenitrothion, Deltamethrin, Lambda cyhalothrin, DDT and Temephos insecticides on two populations of *Aedes aegypti* in Sincelejo city, using the established methodology by OMS. Biochemical tests were also carried out to determine resistance-related enzymes activities including: β esterases, mixed function oxidases and sensitive acetyl cholinesterases to confirm the bioassays results.

High level of DDT and Temephos resistance were detected and the susceptibility to Malathion, Fenitrothion, Deltamethrin and Lambda cyhalothrin insecticides was confirmed in the populations of *Aedes aegypti* tested.

The population of Botero showed an elevation of β esterases enzyme activity, low level of cytochrome P⁴⁵⁰ and sensitive acetyl cholinesterase activity. The population El Cortijo showed low activity in all enzymes.

The results suggest that the β esterases are the mechanism of Temephos resistance in the Botero population and the presence of other mechanism of Temephos resistance, likely the glutathione S transferase enzyme.

It is essential to continue monitoring the resistance of this vector to insecticides in order to ensure the efficiency of programs aimed at vector control and at the protection of human health.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad dengue es causada por un virus de la familia Flaviviridae y es transmitida al hombre por la picadura de mosquitos del género *Aedes* principalmente *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762). En los últimos 20 años la prevalencia del dengue ha aumentado en enormes dimensiones como resultado de la expansión del vector dentro de nuevos nichos ecológicos, la urbanización no planificada y la falta de una política apropiada en el manejo de la salud pública ¹. Se estima que cerca de 2.5 billones de personas procedentes de zonas tropicales y subtropicales están en riesgo de contraer la infección, cada año se presentan de 50 a 100 millones de casos de fiebre por dengue y de 20 a 100 mil casos de fiebre hemorrágica por dengue, lo cual representa un gran impacto en la salud pública ²⁻⁶.

En Colombia el dengue es endémico, se presentan brotes epidémicos cíclicos, en casi todos los asentamientos humanos ubicados por debajo de los 1.800 metros sobre el nivel del mar, lo que equivale a 900.000 Km² de los 1.138.000 Km² de extensión del país donde viven aproximadamente 20.000.000 de personas ⁷. Durante las últimas décadas, a través de diferentes campañas se ha tratado de controlar y prevenir el dengue, así como concientizar a la población acerca de la enfermedad. No obstante, la prevalencia de dengue continua creciendo en todos los estratos sociales, y los esfuerzos parecen tener poco o ningún impacto en las sociedad ¹. Se reportaron 42,536 casos de dengue en el año 2007, lo que cual representa un serio problema de salud pública ⁸.

El Departamento de Sucre, constituye una de las zonas endémicas de dengue en Colombia. En el año 2005 se reportaron 667 casos de la infección, de los cuales 318 casos se registraron en su capital Sincelejo especialmente en las comunas 3,

4 y 5 (DASSSALUD, Sucre) ⁹. El municipio de Sincelejo reúne las condiciones propicias para el mantenimiento y expansión de la enfermedad, debido al acelerado crecimiento poblacional no planificado que genera asentamientos urbanos con problemas de hacinamiento, deficientes servicios sanitarios como los de recolección de desechos sólidos, deficiencia en el suministro de agua potable y atención médica. Además, las creencias y prácticas de la comunidad influyen en el nivel de saneamiento doméstico y determinan la disponibilidad de lugares de producción larval en el entorno domiciliario. A todo esto, se le suma la circulación de los tres serotipos del virus dengue (DEN 1,2 y3) en la zona ¹⁰.

Tradicionalmente, el control y prevención de la enfermedad se basa principalmente en interrumpir el ciclo de transmisión. Esto se realiza a través de la aplicación masiva de insecticidas para disminuir la población vectorial. Sin embargo, la prolongada exposición a los insecticidas y la falta de planeación en su uso han originado la selección de poblaciones de insectos resistentes a una amplia gama de productos que incluyen organoclorados (OCs), organofosforados (OPs), carbamatos y piretroides sintéticos, lo que representa un grave problema para los programas de control ¹¹.

El desarrollo de resistencia en *Aedes aegypti* al larvicida Temefos y a Malatión se ha difundido por todo el Caribe y en algunos países de América central y América del Sur ¹². Estudios sobre el uso indiscriminado de insecticidas en países como Venezuela, Brasil, Perú, Puerto Rico, Cuba y Panamá reportan la aparición de resistencia a algunos insecticidas como Temefos, Pirimifos Metil, Clorpirifos, Cipermetrina, Malatión, Deltametrina y DDT ¹²⁻¹⁸. En Colombia, también se ha detectado resistencia a Temefos y a piretroides en las ciudades de Cali, Cartagena y Buga ^{19,20}.

La resistencia de la mayoría de los insectos vectores a insecticidas, es conferida principalmente por dos tipos de mecanismos. Uno de ellos involucra a enzimas que hidrolizan al insecticida antes de que alcance su sitio de acción, el otro se

basa en mutaciones o cambios en los genes que alteran la sensibilidad del sitio de acción del insecticida. Estudios bioquímicos en *Aedes aegypti* demuestran que existe un incremento en las frecuencias de enzimas como esterasas no específicas, oxidasas de función múltiple y glutatión-s-transferasas en cepas resistentes a insecticidas ²¹.

El control de *Aedes aegypti* en el municipio de Sincelejo, radica principalmente en la extensa aplicación de Temefós contra la fase larvaria del insecto y adulticidas como el Malatión para disminuir la densidad los mosquito y los casos de enfermedad; sin embargo, esta medida no ha sido lo suficientemente efectiva ya que los índices larvarios permanecen por encima de los niveles de riesgo (Índice aéxico de 41%, Índice de depósito del 43% y de Bretau del 70%) ²², y cada año se incrementan los casos de fiebre por dengue y dengue hemorrágico. Se desconocía el estado de susceptibilidad de *Aedes aegypti* a los diferentes insecticidas utilizados para su control, por lo cual el presente estudio se encaminó a determinar los niveles de susceptibilidad en el insecto y detectar la presencia de enzimas relacionadas con resistencia a insecticidas, mediante ensayos biológicos establecidos por la OMS y pruebas bioquímicas. Los resultados obtenidos en esta investigación suministran información clave para la vigilancia de la resistencia en el departamento de Sucre.

2. ESTADO DEL ARTE

El dengue es una enfermedad infecciosa tropical causada por un virus (Familia Flaviviridae) y transmitida por un mosquito del género *Aedes*, *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.

Clínicamente, la enfermedad puede manifestarse como una forma benigna autolimitada de fiebre indiferenciada llamada fiebre por dengue (FD), o como formas más severas denominadas fiebre hemorrágica por dengue (FHD) y síndrome de choque por dengue (SCD), las cuales pueden ser fatales para el individuo ²³.

La infección con el virus del dengue generalmente es sintomática, con fiebre alta, fuerte dolor de cabeza, dolor en las articulaciones, músculos y en los ojos, y erupción en la piel. El dengue clásico afecta a niños y adultos pero rara vez ocasiona la muerte.

Una forma más grave es la fiebre hemorrágica por dengue, cuyos síntomas iniciales son fiebre, tos, cefalea, náuseas, vómitos y dolor abdominal. Después se producen hemorragias, a menudo con inflamación del hígado y, en los casos severos, puede dar lugar a un estado de choque y provocar la muerte si los enfermos no reciben a tiempo la atención médica requerida. No existe un tratamiento específico para esta enfermedad; sin embargo, un cuidado clínico adecuado puede reducir la mortalidad a menos del uno por ciento ^{10,24}.

2.1. AGENTE ETIOLÓGICO.

El virus del dengue está clasificado taxonómicamente de la siguiente forma:

Grupo: Arbovirus.

Familia: Flaviviridae.

Género: Flavivirus.

Especie: Dengue.

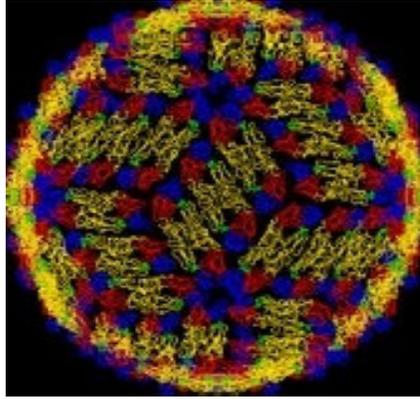


Imagen 1. Virus Del Dengue.

Fuente: [WWW.http://news.uns.purdue.edu/UNS.imágenes/Kuhn.dengue1.ipg](http://news.uns.purdue.edu/UNS.imágenes/Kuhn.dengue1.ipg)

El virus dengue presenta una forma esférica, es relativamente pequeño de aproximadamente 50 nm de diámetro y tiene una membrana lipídica que envuelve la partícula. Existen cuatro serotipos del virus denominado como DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4, los cuales son antigénicamente diferentes. Su genoma se compone de una cadena lineal de ARN de polaridad positiva de 11 kb de longitud. El ARN tiene la característica de poseer una caperuza en el extremo 5' y una cola poliadenilada en el extremo 3', codifica para tres proteínas estructurales (C, M y E) y cinco no estructurales (NS1, NS2A y B, NS3, NS4A y B, y NS5) ^{10, 25}.

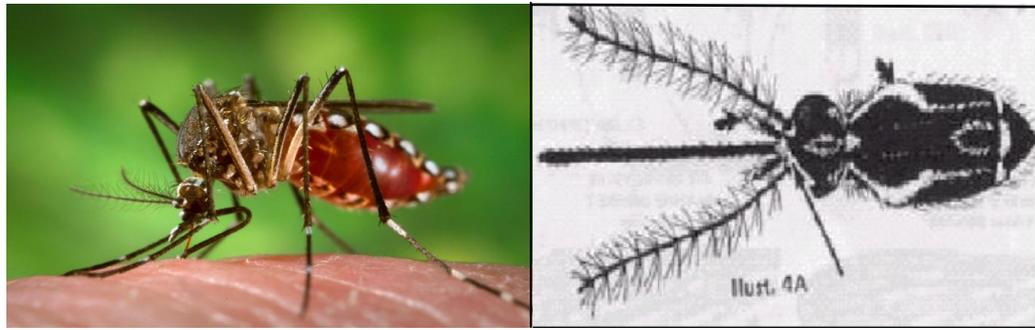
2.2 EL VECTOR

Existen aproximadamente 29 especies del género *Aedes*. Sin embargo, *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* son las principales especies involucradas en la transmisión del dengue.

Aedes aegypti responde a la siguiente clasificación taxonómica:

- Reino: Animalia.
- Phylum: Arthropoda.
- Clase: Insecta.
- Orden: Díptera.
- Familia: Culicidae.
- Subfamilia: Culicinae.
- Género: *Aedes*.
- Subgénero: *Stegomyia*.
- Especie: *aegypti* (Linnaeus 1792).

Es un insecto que presenta una amplia distribución en áreas tropicales y subtropicales del mundo y está limitado a latitudes entre 35° norte y 35° sur, aunque a veces se ha observado en 45° latitud norte. Los mosquitos adultos son pequeños en comparación con otros, miden usualmente entre 3 a 4mm de longitud, es relativamente fácil de reconocerlos una vez emergidos debido a los colores y formas que los caracterizan: son mosquitos negros con escamas de color plateado en el tórax y apéndices locomotores. Las escamas de la región dorsal del tórax dan la apariencia de una lira, las hembras presentan antenas con pelos cortos y escasos, los palpos son de un tercio o menos de longitud que la proboscis; en cambio, en los machos las antenas son plumosas con pelos largos y abundantes y los palpos son del tamaño de la proboscis (Imagen 2).



(a)

(b)

Imagen 2: (a) *Aedes aegypti*, mosquito trasmisor del dengue; (b) Cabeza y Tórax de *Aedes aegypti*.

Fuente: www.cdc.gov

Aedes aegypti presenta una metamorfosis completa y comprende los estados de huevo, larva, pupa y adulto, con excepción del último estado (adulto) que es terrestre, todos los estados se desarrollan en un ambiente acuático (Figura 1). Las hembras de este vector son antropofílicas y desarrollan su ciclo biológico donde habita el hombre, los machos se alimentan de néctares de plantas que se encuentran a su alrededor y frecuentemente están cercanos a las fuentes de alimentación de las hembras para realizar el apareamiento. La actividad de picadura es durante periodos de baja intensidad de la luz solar; en general, se inicia al amanecer o antes del anochecer. Las curvas de actividad alimenticia muestran que hay dos periodos de mayor actividad, más durante el alba que por las noches. Sin embargo, la alimentación puede estar condicionada a la posibilidad de obtener sangre de los habitantes de las casas, pudiendo modificar su actividad y picar a cualquier hora ^{26,27}.

La etapa adulta es una fase en la vida del insecto especializada en la alimentación, reproducción y dispersión. Generalmente el apareamiento se realiza cuando la hembra busca alimentarse. Los huevos, que en cada oviposición de la hembra son de 100 a 150 y menores al milímetro de largo, son inicialmente de

color blanco, para tornarse negros con el desarrollo del embrión que evoluciona en óptimas condiciones de temperatura y humedad en un lapso de 2 a 3 días. Las larvas que emergen inician un ciclo de cuatro estados larvarios, mudan su exoesqueleto desde un largo de 1 mm. a 6 o 7 mm finales y su desarrollo se completa en condiciones favorables de nutrición y con temperatura de 25 a 29 °C en 5 o 7 días. La pupa no requiere alimentación y entre 28 y 32°C completa su desarrollo hasta la emergencia del adulto en 1 a 3 días^{26,27} (Figura 1).

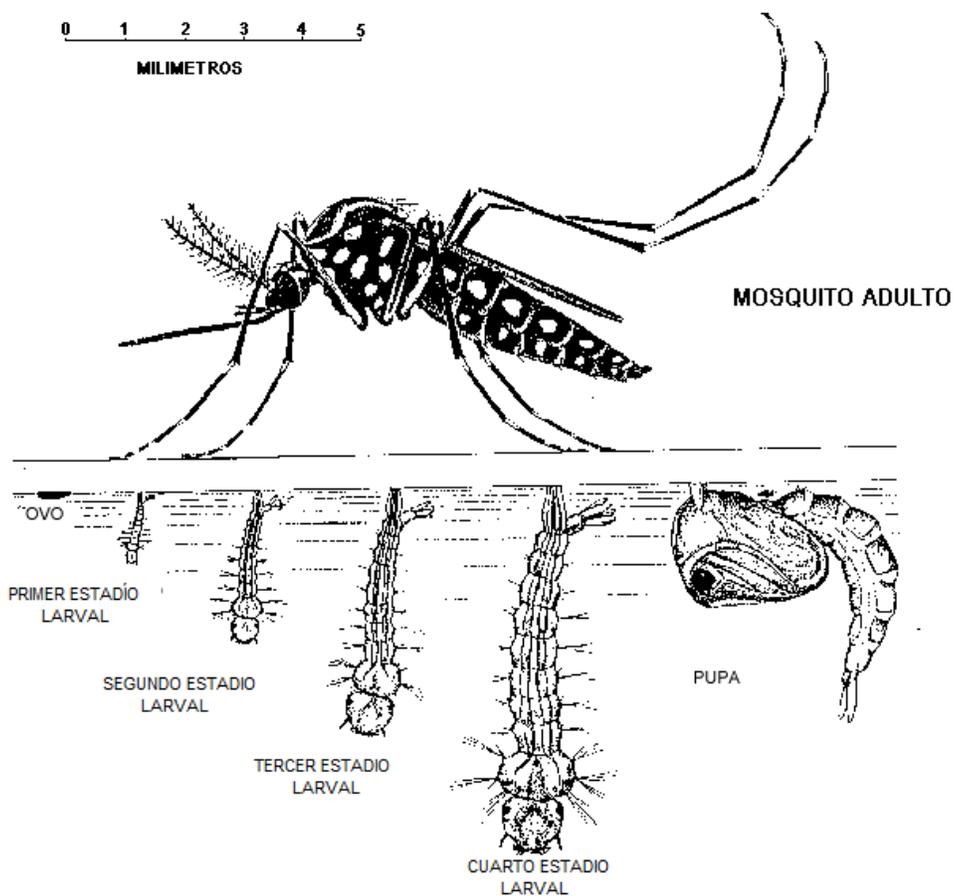


Figura 1. Ciclo biológico de *Aedes aegypti*.

Fuente: www.soaresoliveira.br/combateadengue/doreito.htm

El periodo de vida del mosquito adulto se ve afectado por las características climáticas, principalmente la humedad y la temperatura, pues condicionan sus

actividades de alimentación, reproducción y reposo. A una temperatura inferior a 4°C o superior a 40°C generalmente no sobreviven. *Aedes aegypti* en condiciones naturales sobrevive en promedio de 65 días. La variación de temperatura y humedad, así como la latitud pueden hacer variar estos rangos del ciclo de vida de las cepas de mosquitos. Dichas condicionantes también influyen en su reposo, suele encontrarse cerca de las habitaciones humanas o en el peridomicilio, posado en lugares oscuros y protegidos, relativamente cerca del suelo ^{26,27}.

Una vez que los mosquitos han emergido, se alimentan por primera vez entre las 20 y las 72 horas posteriores. Las alimentaciones subsecuentes se efectúan aproximadamente cada tres días, con el objeto de completar su ciclo gonotrófico; antes de alimentarse buscan el sitio donde harán la oviposición. Entre cada ciclo gonotrófico se ha observado que, a diferencia de otros géneros de mosquitos, *Aedes aegypti* pica o se alimenta varias veces de uno o varios huéspedes, hasta satisfacer sus necesidades alimenticias, factor importante en su capacidad como transmisor de enfermedades ²⁶⁻²⁸.

El desplazamiento de *Aedes aegypti*, es aproximadamente de 200 metros alrededor de sus criaderos, aunque puede encontrarse a distancias mayores a los 200 metros de las casas de donde obtiene su alimentación ²⁶⁻²⁸.

2.3 ESTRATÉGIAS PARA EL CONTROL DEL VECTOR *Aedes aegypti*.

Los métodos de prevención y control de vectores en especial de *Aedes aegypti* se basan principalmente en la aplicación de insecticidas, el manejo ambiental, educación comunitaria y el control biológico.

En la actualidad las principales clases de insecticidas utilizados para el control de vectores son: organoclorados (OCs), ciclodienos, organofosforados (OFs), carbamatos y piretroides, aunque comienzan a utilizarse en gran escala los insecticidas microbianos y los reguladores del crecimiento. Estos insecticidas pueden penetrar en el cuerpo del insecto por una de las siguientes vías ¹¹:

1. Envenenamiento por contacto: el insecticida penetra a través de la cutícula del insecto hasta alcanzar el sitio activo, ejemplo: OPs (Malatión), OCs (DDT), piretroides (Permetrina) o carbamatos (Propoxur), o análogos de las hormonas juveniles (Metopreno) e inhibidores del crecimiento de la quitina (Diflubenzurón).
2. Envenenamiento oral: el insecticida es ingerido y absorbido a través del intestino, ejemplo: insecticidas bacteriológicos, como *Bacillus thuringiensis israelensis*, el cual actúa liberando una endotoxina que destruye las células de la pared del intestino medio.
3. Fumigaciones: el insecticida penetra al cuerpo del insecto a través de los espiráculos del sistema respiratorio.

2.3.1. MODO DE ACCIÓN DE LOS INSECTICIDAS.

2.3.1.1 INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS Y CARBAMATOS:

El modo primario de acción de los insecticidas organofosforados y carbamatos es la inhibición de la acetilcolinesterasa (Ache) en las uniones sinápticas por fosforilación o carbamilación del residuo serina ubicado en el sitio activo de la enzima. Actúan como análogos de la acetilcolina (ACh); son inhibidores inespecíficos e irreversibles de la Ache la cual tiene un rol clave en el sistema nervioso, pues termina los impulsos nerviosos a través de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina. Los organofosforados forman enlaces covalentes muy estables con la enzima fosforilada por lo que las concentraciones sinápticas de acetilcolina aumentan y ocurre una hiperexcitación del Sistema Nervioso Central y la muerte del insecto (Figura 2)^{11, 29-31}.

2.3.1.2 INSECTICIDAS PIRETROIDES:

Los insecticidas piretroides actúan en los canales de sodio dependientes de voltaje en el sistema nervioso, los cuales comprenden cuatro dominios (I – IV), cada uno consiste de seis segmentos transmembranales (S1-S6). Ellos interfieren en cambios conformacionales de las proteínas en la interface lípido-proteína,

provocando un retardo en el cierre de los canales de sodio después que el impulso nervioso ha pasado, de esta forma prolongan la corriente de iones que fluye a través de los canales. Los piretroides se fijan sobre el canal de sodio cuando la puerta está en posición abierta, pero no la mantienen abierta definitivamente, provocan una cinética lenta sobre el cierre del canal de sodio, por lo tanto inducen una prolongación de apertura del canal, lo que corresponde a una prórroga de la fase de despolarización del potencial de acción (Figura 2)^{11,29-31}.

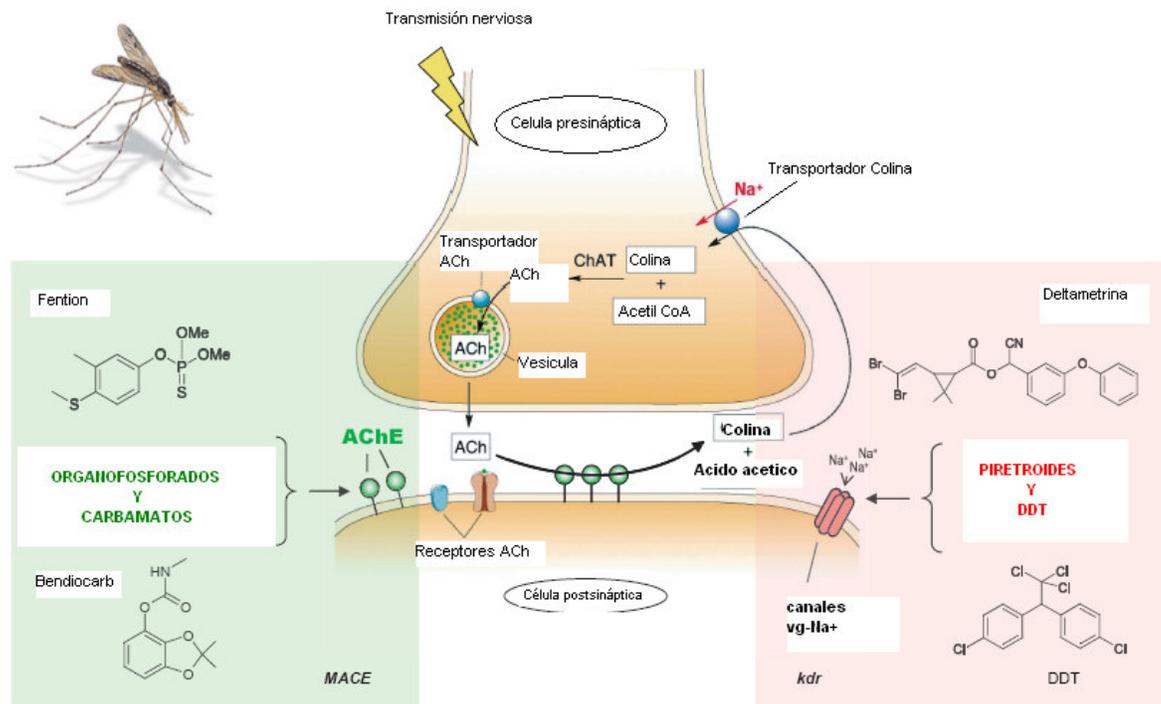


Figura 2: Sitios de Acción de Insecticidas.

Abreviaturas: AchE: acetilcolinesterasa, Ach: acetilcolina, Vg- Na^+ Channel: canales de sodio, MACE: acetilcolinesterasa insensible, *kdr*: resistencia knock down. Las cuatro clases de insecticidas principalmente utilizadas

2.4. RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN INSECTOS VECTORES.

La resistencia es definida como la habilidad de tolerar dosis de tóxicos, las cuales resultarían letales a la mayoría de los individuos en una población normal de la

misma especie según la Organización Mundial de la Salud (1957). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO - 1970), es una respuesta disminuida de la población de una especie de animales o plantas a un plaguicida o agente de control como resultado de su aplicación ^{11,32}.

Durante las últimas décadas, la resistencia a insecticidas continúa siendo el problema técnico más importante que afecta a los programas de control de vectores y plagas en agricultura, medicina veterinaria y salud pública ³³. La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que aproximadamente, el 40% de las especies de insectos de importancia médica han sido detectados con algún grado de resistencia a insecticidas ³⁴. El Comité de Acción de Resistencia a Insecticidas (CARI), reportó 21 especies de *Aedes* resistentes a uno o varios insecticidas, entre ellas se encuentran *Aedes aegypti* y 63 especies de *Anopheles* ³⁵.

Después de la introducción del DDT en 1954 se logró un gran éxito en la erradicación de *Aedes aegypti* en Centro y Sur América ^{32,36}. Sin embargo, la resistencia desarrollada hacia el DDT años más tarde permitió la reinfestación de las zonas antes controladas. En América el primer caso de resistencia en *Aedes aegypti* a DDT, fue reportado en Trinidad (1955) tanto en adultos como en larvas. En 1956, el Programa de Control de *Aedes aegypti* en Cúcuta, Colombia, falló por la aparición de resistencia en este vector al DDT, desde ese momento el desarrollo de resistencia al DDT ha sido reportado en varios países de América ^{32,37}. Debido a la aparición y diseminación de la resistencia al DDT, los países adoptaron insecticidas organofosforados y carbamatos, pero el amplio y exagerado uso de estos ha facilitado el desarrollo de mecanismos de resistencia. En el año 1960 se empezaron a reportar los primeros casos de resistencia a organofosforados y carbamatos en *Aedes aegypti*; Fox ³⁸ reportó una cepa en Puerto Rico resistente a Malatión y Diazinon. Otro tipo de insecticidas que han sido utilizado como alternativa por los programas de control de *Aedes aegypti* son los piretroides sintéticos, no obstante, estos presentan un gran riesgo de resistencia cruzada con insecticidas organoclorados como el DDT.

Investigaciones recientes sobre el uso indiscriminado de insecticidas en América, indican que el desarrollo de resistencia en *Aedes aegypti* se ha difundido por todo el continente. Se reporta resistencia a una gran variedad de insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides así como los mecanismos por los cuales se desarrolla esta habilidad que facilita la supervivencia del vector ^{12-20, 39,40} y por consiguiente la transmisión de la enfermedad por dengue.

En Colombia, las poblaciones de *Aedes aegypti* han sido altamente presionadas por todos los tipos de insecticidas. Estudios sobre el estado actual de la resistencia en las poblaciones del mosquito en el país indican que aún existe resistencia al DDT. Además la susceptibilidad al larvicida Temefos, Malatión y al piretroide Lambdacyhalotrina ha disminuido, lo que sugiere que las poblaciones de *Aedes aegypti* del país pueden generar resistencia a todos los insecticidas utilizados ⁴¹⁻⁴⁴.

2.4.1 TIPOS DE RESISTENCIA.

2.4.1.1 RESISTENCIA MÚLTIPLE:

Se atribuye el término de resistencia múltiple cuando dos mecanismos de resistencia o más están operando en el mismo insecto. Cuando dos mecanismos de resistencia actúan sobre un mismo insecticida, el nivel de resistencia es a menudo mucho mayor que la adición simple de los niveles de resistencia conferidos por ambos mecanismos de forma independiente. El término de resistencia múltiple no necesariamente involucra el término de resistencia cruzada, porque un insecto puede ser resistente a dos insecticidas o más, y cada resistencia puede ser atribuida a diferentes mecanismos ¹¹.

2.4.1.2 RESISTENCIA CRUZADA:

En términos actuales hay que hablar de resistencia cruzada para definir el mecanismo por el cual un gen simple confiere resistencia a un número de químicos del mismo grupo, tal es el caso de las fosfotriesterasas que brindan

resistencia a varios organofosforados, o a diferentes grupos, como el gen *kdr* que confiere resistencia al DDT y a los piretroides ^{11,45} (Figura 3).

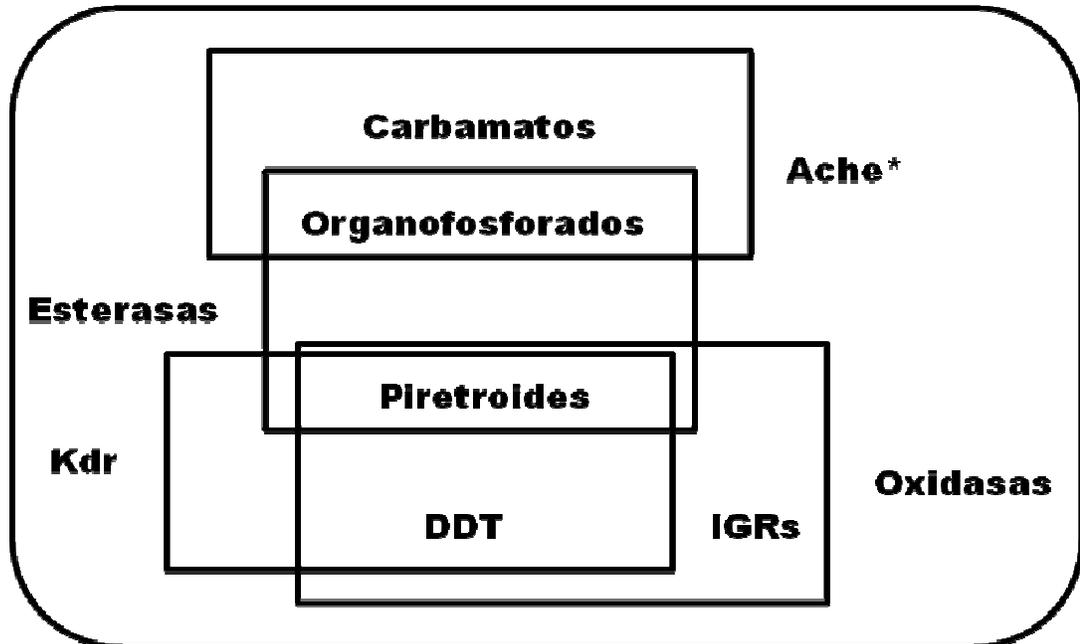


Figura 3. Resistencia Cruzada a insecticidas.

2. 5 MECANISMOS DE RESISTENCIA EN INSECTOS.

Los principales mecanismos de resistencia a insecticidas en insectos pueden ser divididos en dos grupos, sitio de acción (mutaciones en los genes que codifican para el canales de Na⁺, Acetilcolinesterasa y receptor GABA) o metabólico (alteración en los niveles o actividades de detoxificación del insecticida). Solos o en combinación estos mecanismos confieren resistencia a todas las clases de insecticidas disponibles.

2.5.1 RESISTENCIA POR ALTERACIONES EN EL SITIO DE ACCIÓN DEL INSECTICIDA:

2.5.1.1 ACETILCOLINESTERASA INSENSIBLE.

El blanco de insecticidas organofosforados y carbamatos es la Acetilcolinesterasa (AChE) en la sinapsis nerviosa. La resistencia a estos compuestos resulta de la sobreproducción de isoformas o mutantes de la enzima las cuales presentan centros catalíticos alterados. Las mutaciones que se presentan en la enzima estrechan el sitio activo, obstaculizando el acceso a los residuos catalíticos, los cuales son necesarios para la unión del insecticida. La mosca doméstica ha mostrado cinco puntos de mutaciones en el gen de la AChE, las cuales solas o en combinación le confieren un amplio espectro de resistencia a insecticidas^{21, 30,46}. En las especies de insectos existen dos patrones de resistencia en este sitio de acción de organofosforados y carbamatos. El patrón de resistencia I que le confiere alta resistencia a carbamatos y baja a Organofosforados, mientras que el patrón II el nivel de resistencia a organofosforados y carbamatos es equivalente, excepto en el caso de *Bactrocera oleae* que es específica de organofosforados⁴⁷.

2.5.1.2 ALTERACIONES EN EL CANAL DE SODIO DEPENDIENTE DE VOLTAJE.

Las neurotoxinas afectan la función de los canales de Na⁺ alterando varias propiedades del canal como son: conductancia iónica, selectividad iónica, activación o inactivación de este. Los insecticidas Piretroides y DDT son grandes neurotoxinas que actúan sobre los canales de Na⁺, los cuales inician y propagan el potencial de acción en el sistema nervioso. La resistencia a este tipo de compuestos es conocida como resistencia ``Knockdown ó kdr`` ocurre debido a un cambio entre la afinidad del insecticida y su sitio de unión en los canales de Na⁺, causado por una simple o múltiples sustituciones en los genes que codifican las proteínas del canal. Es posible que un número limitado de sustituciones en el sitio

de acción pueda permitir la insensibilidad del nervio. En varias especies de insectos, la mutación kdr más común es la sustitución de una Leucina por una Fenilalanina (Lue a Phe) en el segmento hidrofóbico S6 del dominio II del gen *para* del canal de Na⁺, como se encontró en una cepa de *Anopheles gambiae* y *Anopheles stephei* del oeste africano. Sin embargo, una segunda mutación en la misma posición (Leu a Ser) se ha encontrado en *Anopheles gambiae* del Este de África. Más de 20 sustituciones en los canales de Na⁺ de insectos han sido identificadas y están involucradas en la reducción de la sensibilidad a insecticidas, todas ellas se encuentran localizadas en el dominio II del canal ^{21, 30,48- 55}.

2.5.2 RESISTENCIA METABÓLICA.

Tres familias de enzima son las responsables del metabolismo de insecticidas: Esterasas no específicas o carboxilesterasas, Monoxigenasas (Citocromo P⁴⁵⁰) y las Glutación-S-Transferasas (GSTs) (Tabla 1). Estas proteínas están involucradas en la síntesis y desdoblamiento de una gran cantidad de compuestos metabólicos endógenos, de la protección contra el estrés oxidativo, con la transmisión de señales nerviosas y el transporte de compuestos a través de la célula ^{21,30}.

2.5.2.1 CARBOXILESTERASAS.

Es un término colectivo para aquellas enzimas que hidrolizan esteres carboxílicos, se clasifican en esterasas A y esterasas B según la clasificación de Aldridge 1953, el término carboxilesterasa es principalmente atribuido a las esterasas B las cuales presentan un residuo de serina en su sitio activo. La sobreproducción de esterasas no específicas como una respuesta evolucionaría a la presión selectiva de insecticidas organofosforados y carbamatos, ha sido reportada en numerosas especies de artrópodos incluyendo mosquitos, garrapatas y cucarachas ^{21,30, 56-59}.

Las esterasas amplificadas pueden comprender alrededor del 0.4% de la proteína total del insecto, todas actuando rápidamente en el secuestro e hidrólisis del insecticida. La causa predominante de esta excesiva síntesis de enzima es la amplificación o duplicación génica dentro del genoma del individuo, aunque se ha reportado también una sobre regulación transcripcional. Existen muchos alelos de esterasas asociados con resistencia, el genotipo más común es la co-amplificación de dos genes de altamente resistente ^{21, 30,56-59}. esterasas (*estα2¹* y *estβ2¹*) en un amplicón de 28 kb, el cual se repite alrededor de 80 veces en el genoma de *Culex quinquefasciatus*

Esta ventaja selectiva puede ser no solo por la contribución de dos genes de esterasas, sino por la presencia en el mismo amplicón de un tercer gen conocido como aldehído oxidasas con presuntiva capacidad detoxificadora, este gen se encuentra justamente aguas arriba del gen *estα2¹* (Figura 4) ^{21,30,56-59}.

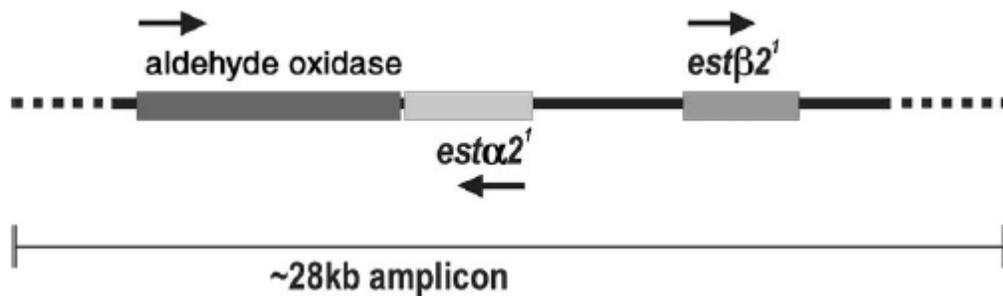


Figura 4: Amplicón resistente a Organofosforados de una cepa de *Culex quinquefasciatus* PelIRR. Fuente: The Molecular Basis of Two Contrasting Metabolic Mechanisms of Insecticide Resistance 30: 1009-1015 (2000).

2.5.2.2 OXIDASAS DE FUNCIÓN MÚLTIPLE.

El Citocromo P⁴⁵⁰ comprende un grupo de 100 enzimas diferentes en insectos, ellas pueden agruparse dentro de familias de acuerdo a sus secuencias de aminoácidos y sus relaciones filogenéticas, catálisis de la inserción de uno de los átomos de oxígeno molecular (O₂) dentro de un sustrato, y esta oxidación podría

resultar en la activación o detoxificación de insecticidas piretroides y organofosforados. La diversidad del Citocromo P⁴⁵⁰ es conferida por la existencia de múltiples isoformas P⁴⁵⁰, diferentes patrones de expresión y amplio espectro de sustrato. La detoxificación mediada por Citocromo P⁴⁵⁰ monoxigenasas es un mecanismo de resistencia muy importante y no solo confiere altos niveles de resistencia, sino que provee resistencia cruzada a una amplia gama de compuestos por la variedad de sustratos que esta enzima puede metabolizar. La resistencia a insecticidas por el Citocromo P⁴⁵⁰ resulta de la sobreexpresión de los miembros de una o más familias del Citocromo P⁴⁵⁰ antes que mutaciones en la estructura de sus genes. Este tipo de enzimas es responsable de la resistencia a organofosforados, piretroides y en menor extensión a carbamatos ^{21, 30,57-59}. Existen reportes que demuestran la elevada actividad de las monoxigenasas en mosquitos resistentes a insecticidas, frecuentemente con ayuda de otras enzimas como esterasas. Valule *et al* 1999 demostró niveles elevados de oxidasas y esterasas en una cepa de *Anopheles gambiae* de Kenia ⁶⁰. Brogdon *et al* 1999 reportó mecanismos de resistencia basados en esterasas y oxidasas en una cepa de *Anopheles albimanus* de Guatemala ⁶¹.

2.5.2.3 GLUTATIÓN-S-TRANSFERASAS.

Existen dos clases de Glutatión – S – Transferasas (GSTs), clasificadas de acuerdo a su localización dentro de la célula: microsomales y citosólicas. La mayoría de las GSTs citosólicas son proteínas diméricas que comprenden dos subunidades cada una alrededor de 24-28 KDa, cada subunidad tiene dos sitios de unión el G y el sitio H; el sitio G altamente conservado une el tripeptido glutatión, el sitio H o sitio de unión del sustrato es variable en estructura. Se considera que la función primaria de las GSTs es generalmente detoxificación de compuestos endógenos y xenobióticos directamente o catalizando una gran cantidad de compuestos oxidados por el Citocromo P⁴⁵⁰. Las GSTs juegan un

papel muy importante en el estrés fisiológico y han sido implicadas en el transporte intracelular y en varias vías biosintéticas. El incremento en la actividad de estas enzimas ha sido implicado en la resistencia a por lo menos dos clases de insecticidas: organofosforados y el organoclorado DDT. Los altos niveles de una o más GSTs son el resultado de la amplificación génica o más comúnmente del incremento en la tasa de transcripción de los genes antes que cambios cualitativos en la enzima ^{21, 30,57-59}.



INSECTICIDAS	METABÓLICA			SITIO ALTERADO	
	ESTERASAS	OXIDASAS	GLUTATIÓN -S-TRANSFERASAS	Kdr	MACE
PIRETROIDES					
ORGANO FOSFORADOS					
DDT					
CARBAMATOS					

Tabla 1. Principales Mecanismos de Resistencia a Insecticidas. Las enzimas que confiere resistencia a insecticidas son: Esterasas, Oxidasas y Glutación-S-Transferasas. Los principales mecanismos sitio-blanco son: resistencia knock-down y MACE (Modificaciones en la acetilcolinesterasa). La importancia de cada mecanismo es indicado por el tamaño del circulo.

2.6 BIOENSAYOS DE RESISTENCIA.

Se basan en la respuesta a la dosis y tiempo de exposición. Estos factores son importantes en la determinación de la cantidad de químicos necesarios para conseguir la mortalidad de un cierto porcentaje de mosquitos.

La OMS ha desarrollado procedimientos normalizados de biovaloración y equipos para determinar la susceptibilidad o resistencia de las larvas y mosquitos adultos a los insecticidas.

La prueba en adultos involucra la aplicación de insecticidas a papel filtro, el contacto y duración varía en cada prueba, generalmente 24 horas después de la exposición, el número de mosquitos muertos y la dosis letal es determinada ⁶². Para confirmar algún cambio en la susceptibilidad de una población evaluada a través de los bioensayos se realizan pruebas bioquímicas que informan sobre resistencia a insecticidas y detectan la presencia de los mecanismos de resistencia a nivel bioquímico en insectos individuales, frescos o congelados. La principal ventaja de este método es que es posible detectar la resistencia a baja frecuencia en una población. Además provee más información por insecto, sobre el estado de la resistencia de la población y sus patrones de resistencia cruzada. Con estos ensayos se puede medir el efecto del tratamiento con insecticidas en el campo, conociendo la frecuencia de los mecanismos de resistencia específicos y la posible disminución de esta frecuencia en ausencia de presión selectiva con el insecticida ⁶²⁻⁶³.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General.

- Evaluar el nivel de susceptibilidad a insecticidas en *Aedes aegypti* capturados en la ciudad de Sincelejo.

3.2 Objetivos Específicos:

- Determinar la susceptibilidad a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti* en el municipio de Sincelejo.
- Detectar la presencia de enzimas relacionadas con resistencia a insecticidas en la población de *Aedes aegypti* presente en la zona de estudio.

4. METODOLOGÍA

4.1 ÁREA DE ESTUDIO.

El estudio se llevó a cabo en el municipio de Sincelejo (9° 18 N`, 75° 25`O), Departamento de Sucre, Colombia. Este municipio está localizado a 218 metros de altura, en una región de sabana de la Costa Caribe colombiana, corresponde a una zona de vida bosque seco tropical cuya temperatura promedio anual alcanza los 27°C, humedad relativa de 77 – 80% y una precipitación anual es de 1000 a 1300mm.

El muestreo de larvas de *Aedes aegypti* se realizó en los sectores El Cortijo y Botero considerados de alto riesgo para la enfermedad según el informe de casos suministrados por Dasssalud, Sucre 2006 ⁶⁴. Estas zonas presentan las condiciones epidemiológicas favorables para la presencia del vector ya que sus habitantes almacenan agua en forma inadecuada frecuentemente en recipientes, los cuales se convierten en criaderos para el mosquito. Además se encuentran separadas geográficamente lo que permite inferir sobre el comportamiento del vector en los diferentes sectores de la ciudad.

4.2 RECOLECCIÓN DE LARVAS DE *Aedes aegypti*.

Se realizó un muestreo aleatorio por conglomerados en los sectores de estudio, el número de casas inspeccionadas se obtuvo a partir de las tablas establecidas por OPS/OMS (ver Anexo 4) teniendo en cuenta el número de casas de cada sector. En el sector El Cortijo fueron visitadas 231 casas y en el sector Botero 189 viviendas. Todos los depósitos encontrados en el interior y alrededor de las viviendas inspeccionadas fueron examinados cuidadosamente incluyendo albercas, tanques bajos, recipientes, neumáticos no protegidos de la lluvia,

floreros etc. (Imagen 3), en busca de larvas de mosquito. Se recolectaron todas las larvas de tercer y cuarto estadio utilizando pipetas de succión, las larvas se almacenaron en frascos de vidrio los cuales fueron debidamente rotulados. Una vez recolectado el material de campo fue transportado al Laboratorio de Entomología de Dasssalud en neveras de icopor para evitar el aumento de la temperatura y el maltrato de las larvas. Las larvas colectadas se identificaron en el laboratorio utilizando las claves de mosquitos que se crían en recipientes expuestas por Milton Tinker ⁶⁵. Para los bioensayos con larvas y adultos se utilizó la segunda generación (F2).



Imagen 3. Recolección de larvas de *Aedes aegypti*.

4.3 MANTENIMIENTO DE LAS COLONIAS DE *Aedes aegypti*.

Las larvas colectadas en los sectores El Cortijo y Botero se transfirieron a bandejas esmaltadas con 2 litros de agua reposada y sin cloro, donde se alimentaron con comida para peces según lo descrito por Vidal ⁶⁶ y fueron criadas hasta el estado de pupa. Las pupas se colocaron en vasos de icopor con malla para su posterior traslado a jaulas de cría de 30x30x30cm (Imagen 4).

Los mosquitos se alimentaron con una solución azucarada al 10% y con sangre de ratón como fuente proteica cada día y medio. Los huevos se obtuvieron colocando una banda de papel toalla humedecida la cual estaba marcada con el nombre de la cepa, fecha y el número de generación dentro de las Jaulas de cría

no por más de cinco días para obtener una buena cantidad de huevos. La toalla de papel se mantuvo sumergida en agua hasta la mitad del vaso para conservar la humedad. Las colonias se mantuvieron en el laboratorio a una Temperatura de 27°C, Humedad Relativa aproximada del 70% y un foto período de 11 horas luz.



Imagen 4. Mantenimiento de las larvas y adultos de *Aedes aegypti* en el laboratorio.

4.4 BIOENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD/RESISTENCIA A TEMEFOS EN LARVAS.

Se determinó la susceptibilidad al larvicida Temefos (O, O, O´O´- tetrametil-O, O´-tiodi p-fenilen difosforotionato) en la generación F2 de las dos colonias de *Aedes aegypti* establecidas en el laboratorio, de acuerdo a los parámetros y procedimientos recomendados por la OMS utilizando larvas de cuarto estadio temprano. Se emplearon cuatro réplicas (25 larvas por cada réplica) las cuales se trataron con 1 mL de solución alcohólica de Temefos a una concentración de 0.0012 ppm para obtener una concentración final en los recipientes con las larvas de 0.012 ppm, concentración que corresponde a la dosis diagnóstica establecida por el Instituto Nacional de Salud Colombia. Cada prueba se verificó con un control al cuál se le agregó 1 mL de etanol sin insecticida (Imagen 5).

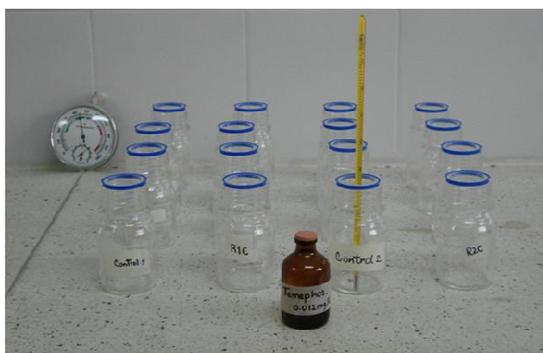


Imagen 5. Bioensayos de susceptibilidad en larvas de *Aedes aegypti*.

Se registraron los datos de la temperatura media del agua y la humedad relativa al inicio y al final de la prueba.

La lectura de la mortalidad se hizo a las 24 horas postexposición, considerando como muertas las larvas que presentaban un movimiento anormal de tal manera que si se encontraban en la superficie del agua no fueron capaces de sumergirse hasta el fondo del recipiente o que de lo contrario si se encontraban en el fondo no fueron capaces de subir a la superficie.

De igual forma aquellas que no se movían al ser punzadas en el sifón o en la región cervical.

Las pruebas con una mortalidad en el control igual a 20% fueron descartadas, mientras que en aquellas donde estuvo entre 5 - 19% se realizó la corrección de la mortalidad empleando la formula de Abbot.

Formula de Abbot:

$$\frac{\% \text{ mortalidad de la prueba} - \% \text{ mortalidad del control}}{100 - \% \text{ mortalidad del control}} \times 100$$

Los resultados obtenidos se tabularon en una hoja de registro (Ver Anexo 1) y se compararon con los datos de los bioensayos de susceptibilidad de la cepa Rockefeller.

4.5 BIOENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD/RESISTENCIA EN ADULTOS.

Esta prueba se realizó teniendo en cuenta la metodología de la O. M. S ⁶⁰.

Para estos ensayos biológicos con compuestos adulticidas se seleccionaron hembras adultas de menos de 3 días de nacidas provenientes de la población F2 recolectada en campo. Las hembras fueron alimentadas previamente con sangre de ratón.

Se utilizó el kit de la O.M.S. que contiene papeles impregnados con Malatión 5%, Fenitrotión 1%, DDT 4%, Deltametrina 0.05% y Lambdacyhalotrina 0.05%, los cuales se insertaron en tubos de exposición (de color rojo). Dentro de tubos de observación (de color verde), se insertaron hojas de papel en blanco y limpias sujetas con ganchos de resorte de acero y cobre. Seguidamente se introdujo un lote de 25 mosquitos aproximadamente en el tubo de observación, después de un tiempo de 15 min de reposo, este tubo se unió al tubo de exposición y con leves soplos, los mosquitos se transfirieron al tubo con los papeles impregnados de insecticida (Imagen 6). El tiempo de exposición para cada insecticida fue de 1 hora con excepción de Fenitrotión para el cual se emplearon dos horas de exposición.

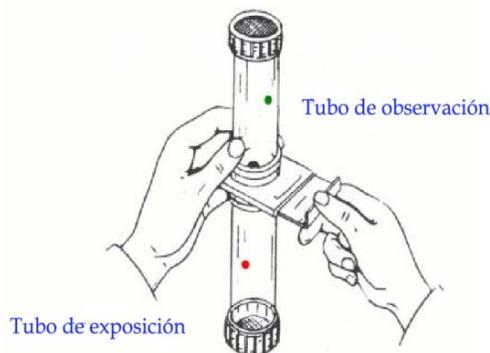


Imagen 6: Bioensayos de susceptibilidad en adultos de *Aedes aegypti*.

Para cada insecticida se realizaron tres repeticiones, cada repetición consistió de cuatro replicas y un control, después del tiempo de exposición, los mosquitos se

transfirieron hacia el tubo de observación nuevamente y se dejaron en reposo por 24 horas bajo condiciones controladas de temperatura entre 25 °C y 30 °C y humedad relativa entre 60% y 90%. Luego de transcurridas las 24 horas se registraron los datos de mortalidad, temperatura y humedad relativa en un formulario (Ver Anexo 2 Y 3).

Para la evaluación de insecticidas piretroides, se registró el número de mosquitos caídos cada 10 minutos durante el período de exposición y a las 24 horas el porcentaje de mortalidad y recuperación.

4.6 ENSAYOS BIOQUIMICOS.

Las poblaciones de mosquito de los sectores El Cortijo y Botero fueron sometidas a pruebas para la detección de posibles mecanismos bioquímicos implicados en la resistencia a los principales insecticidas utilizados en el municipio para su control. Los mecanismos evaluados incluyeron Esterasas no específicas (NSE), Monoxigenasas y Acetilcolinesterasas Inhibida por Propoxur. La actividad de las enzimas se determinó según la metodología de Brogdon⁶⁷. Un promedio de 30 a 60 mosquitos de la cepa Botero fueron analizados para cada prueba, mientras que en la cepa El Cortijo se analizó un promedio de 30 a 60 individuos, la detección de cada enzima fue realizada tres veces en el mismo mosquito y al final se promediaron los valores de absorbancia obtenidos por las replicas del mismo mosquito.

4.6.1 Detección de Esterasas no Específicas.

Los mosquitos fueron homogenizados individualmente en 100 µL de buffer fosfato de potasio a 0.01M, pH 7.2 y diluidos a 1 mL. Alícuotas de 100 µL de cada homogenizado fueron transferidas a los pozos de las placas de microtitulación. Seguidamente se le añadió 100 µL de β- Naftil acetato a cada celda y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Luego se le adicionó 100 µL de Dianisidine a

cada pozo, se incubo por 2 min y se leyó la absorbancia a una densidad óptica de 540 nm.

4.6.2 Detección de Monoxigenasas (Citocromo P⁴⁵⁰).

Los insectos fueron individualmente homogenizados en 100 µL de buffer fosfato de potasio a 0.01M, pH 7.2 y diluidos a 1 mL. Alícuotas de 100 µL de cada homogenizado fueron transferidas a los pozos de las placas de microtitulación. Seguidamente se le adicionaron 200 µL de TMBZ (3, 3', 5, 5',- tetrametilbenzodine dihidroclorado) y 25 µL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3%. Luego se incubó por 5 min. y posteriormente se realizó la lectura a una densidad óptica de 620 nm.

4.6.3 Detección de Acetilcolinesterasa Insensible.

En los pozos de la placa se colocó 100 µL de cada muestra del homogenizado de mosquito y se le añadió 100 µL de solución substrato acetilcolina yodada (ATCh) con Propoxur. Seguidamente se le añadió 100 µL de DTNB (ditio-bis-2- ácido nitrobenzoico). Inmediatamente se leyó la absorbancia a una densidad óptica de 414nm, que corresponde al T₀. Posteriormente se leyó nuevamente a los 10 min a la misma densidad óptica, correspondiente al T₁₀.

4.7 CRITERIOS DE EVALUACIÓN.

El estado de susceptibilidad/resistencia de las poblaciones del mosquito expuestas en los bioensayos con papeles impregnados fue evaluado de acuerdo a los criterios de interpretación de la OMS ⁶⁰. Así:

El 98-100% de mortalidad indica susceptibilidad.

Menos del 80% indica resistencia.

Entre el 80 y 98% Vigilancia.

Los resultados de las enzimas presentes en *Aedes aegypti* de la ciudad de Sincelejo fueron comparados con los resultados arrojados por la cepa susceptible Rockefeller del Instituto Nacional de Salud de Colombia para establecer si las enzimas implicadas en la resistencia a insecticidas se encontraban incrementadas con relación a la cepa susceptible.

5. RESULTADOS

5.1 IDENTIFICACIÓN DE LARVAS Y ADULTOS DE *Aedes aegypti*.

La identificación de las larvas y adultos de *Aedes aegypti* se realizó teniendo en cuenta sus características morfológicas:

Larvas:

- ✚ Cuatro estructuras de la cabeza de la larva del mosquito son importantes en su identificación: la antena, seta prenatal, seta inferior de la cabeza y seta superior de la cabeza.
- ✚ El tórax presenta muchas setas, tiene cuatro espinas laterales oscuras, dos a cada lado del tórax en la base de las setas plúmeas laterales y el tegumento es liso (Figura 7 A).
- ✚ En el octavo segmento del abdomen hay pequeñas estructuras llamadas dientes del peine, que en conjunto forman un peine. Los dientes del peine son pocos en número y arreglados en una sola hilera (Figura 7 B).
- ✚ El sifón es una estructura corta y cilíndrica sobre el octavo segmento abdominal. Una hilera de dientes pequeños en forma de peine llamada pecten (palabra latina para peine) está presente en el sifón (Figura 7 D).
- ✚ El segmento anal que nace del octavo segmento abdominal presenta una placa anal, la cual tiene un pelo lateral doble (Figura 7 C).

Adultos:

- ✚ Carecen de anillo de escamas blancas en la proboscis.

- ✚ Las escamas en las patas están formadas por bandas de color plateado.
- ✚ Los tarsos presentan bandas basales en cada segmento.
- ✚ Las hembras presentan antenas con pelos cortos y escasos, los machos tienen antenas plumosas con pelos largos y abundantes (Figura 7 F y G).
- ✚ En las hembras los palpos son de un tercio o menos de longitud que la proboscis y en los machos son del tamaño de la proboscis (Figura 7 F y G).
- ✚ Las escamas en el mesonotum consisten de líneas plateadas, las cuales forman una lira. A su vez los palpos son plateados (Figura 7 E Y H).

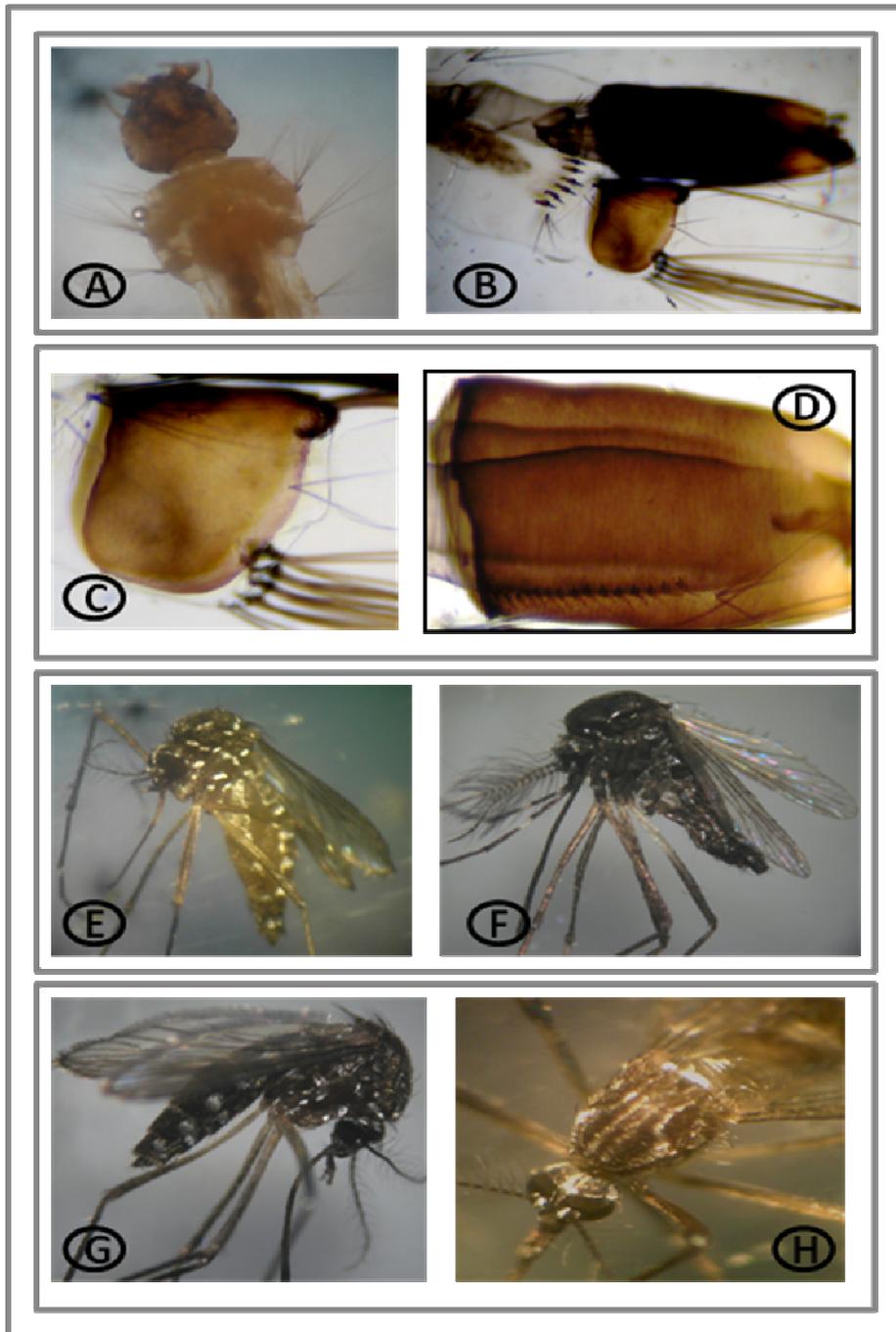


Imagen 7. Identificación de larvas y adultos de *Aedes aegypti* en el laboratorio:

A. Tórax de una larva: **B.** Dientes del peine: **C.** Segmento anal: **D.** Pecten en el sifón: **E.** Adulto hembra: **F.** Palpos largos en un adulto macho: **G.** Palpos cortos en una hembra: **H.** Mesonotum.

5.2 BIOENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD/RESISTENCIA A TEMEFOS EN LARVAS.

La población larval de estudio estuvo constituida por un total de 300 larvas, 200 pertenecientes al sector El cortijo y 100 al sector Botero.

Las dos poblaciones del mosquito presentaron niveles de mortalidad compatibles con resistencia (12.25% y 79.68% respectivamente). El porcentaje de mortalidad de la población el Cortijo fue bastante bajo, lo que indica un alto nivel de resistencia a la dosis diagnóstica de Temefós 0,012 ppm (Tabla 2).

La cepa Rockefeller (control) mostró un porcentaje de mortalidad de 100%, validando los resultados obtenidos.

Cepa	Larvas Expuestas	% Mortalidad	Estado de Resistencia
Rockefeller	100	100	Susceptible
Cortijo	200	12.25	Resistente
Botero	100	79.68	Resistente

Tabla 2. Bioensayos en larvas de *Aedes aegypti* evaluando la dosis diagnóstica (0.012 ppm.) para Temefós.

5.3 BIOENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD/RESISTENCIA EN ADULTOS.

Un total de 2.495 hembras de *Aedes aegypti* pertenecientes a los sectores El Cortijo y Botero fueron expuestas a papeles impregnados con DDT 4%, Malatión 5%, Fenitrotión 1%, Lambdacyhalotrina 0,05% y Deltametrina 0,05% (Tablas 3 y 4).

Insecticidas	Individuos Expuestos	% de Mortalidad 24 horas.	Estado de Susceptibilidad.
DDT	190	5.8	Resistente
Malatión	290	100	Susceptible
Fenitrotión	279	94.13	Susceptible
Lambdacialotrina	264	81.45	Susceptible
Deltametrina	263	95.19	Susceptible

Tabla 3. Estado de susceptibilidad a insecticidas organofosforados, al organoclorado DDT y piretroides en adultos de *Aedes aegypti* de el sector El Cortijo.

Insecticidas	Individuos Expuestos	% de Mortalidad 24 horas.	Estado de Susceptibilidad.
DDT	268	9.08	Resistente
Malatión	244	100	Susceptible
Fenitrotión	253	98.50	Susceptible
Lambdacialotrina	271	84.91	Susceptible
Deltametrina	272	95.58	Susceptible

Tabla 4. Estado de susceptibilidad a insecticidas organofosforados, al organoclorado DDT y piretroides en adultos de *Aedes aegypti* del sector Botero.

Según los criterios establecidos por la OMS, la cepa Cortijo mostró una mortalidad de 5,8 % que indica resistencia a DDT, es 100 % susceptible a Malatión. También se observa una disminución de la susceptibilidad frente a los insecticidas Fenitrotión, Lambdacyhalotrina y Deltametrina, estado que debe ser vigilado periódicamente (Figura 5).

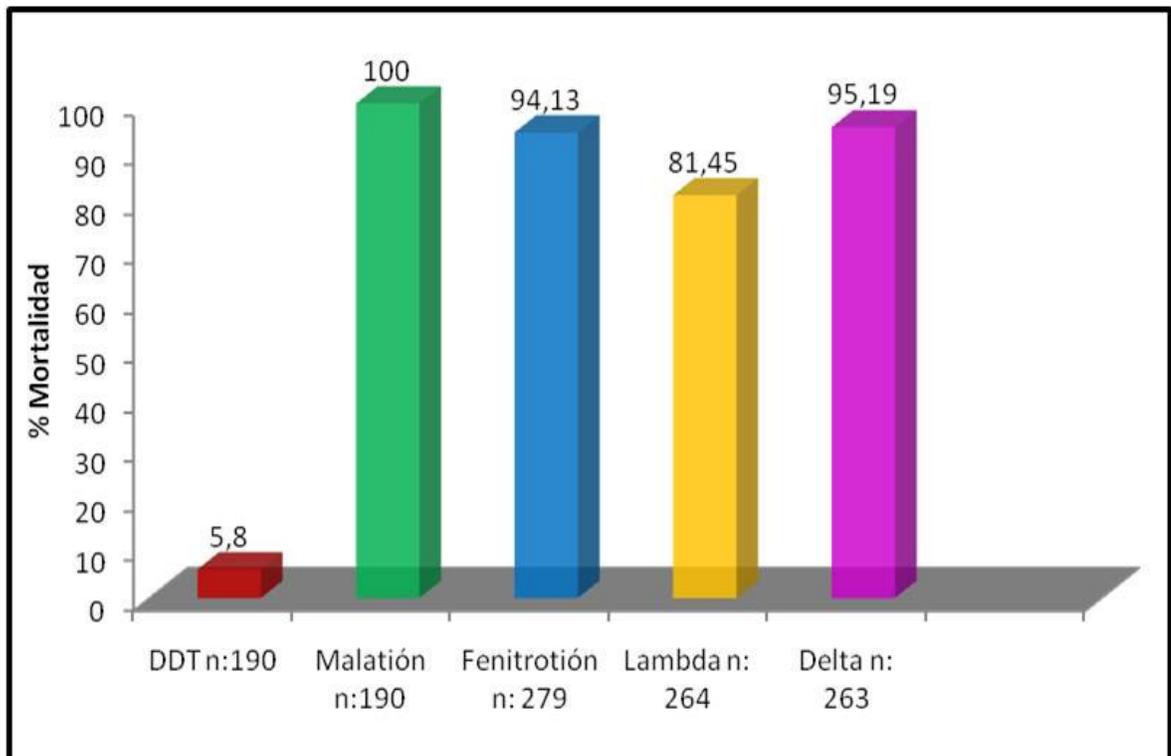


Figura 5: Porcentaje de Mortalidad en Adultos de *Aedes aegypti* de la cepa Cortijo expuestos a papeles impregnados con insecticidas.

En la población de hembras de *Aedes aegypti* del sector Botero se observó un porcentaje de mortalidad de 100% y 98,5% al ser expuesta a los insecticidas Malatión y Fenitrotión respectivamente, esto revela la susceptibilidad de la población a estos insecticidas organofosforados, mientras que la cepa es resistente a DDT y la susceptibilidad a los piretroides Lambdacyhalotrina y Deltametrina es disminuida (Figura 6).

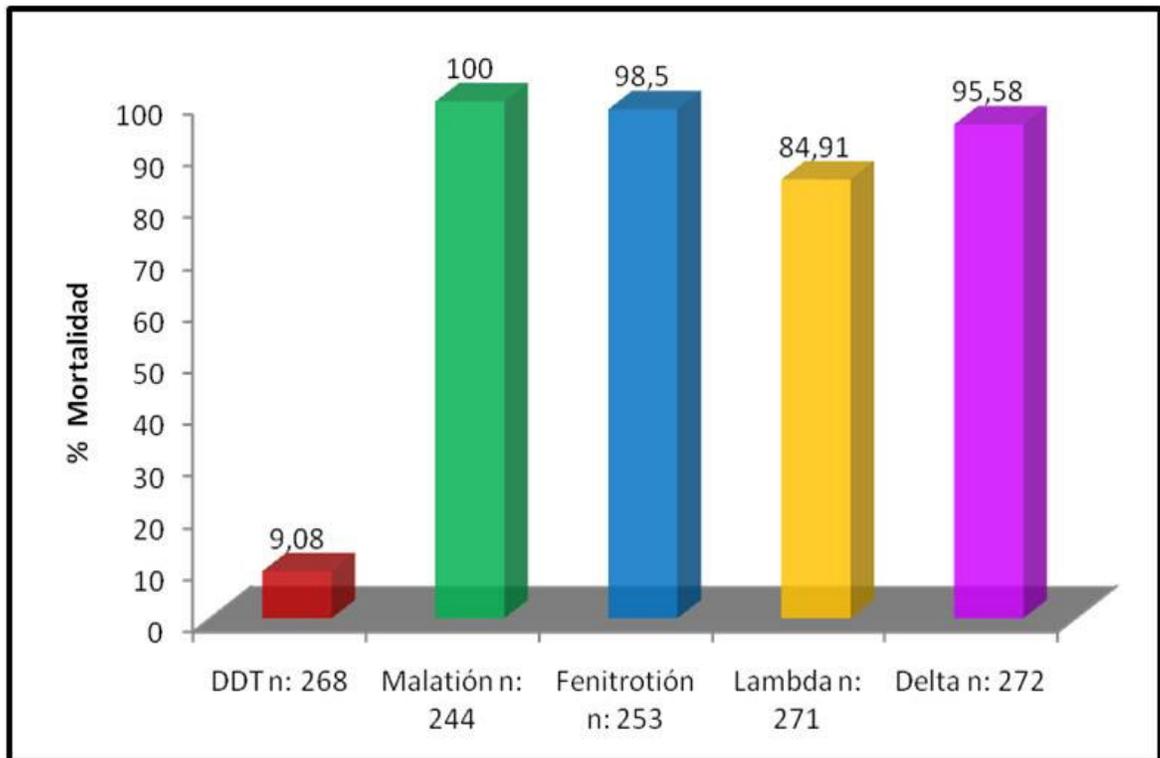


Figura 6: Porcentaje de Mortalidad en Adultos de *Aedes aegypti* de la cepa Botero expuestos a papeles impregnados con insecticidas.

5.4 ENSAYOS BIOQUÍMICOS.

Se aplicaron pruebas bioquímicas para determinar el nivel de β esterasas, Citocromo P⁴⁵⁰ y Acetilcolinesterasa Inhibida en cepas de *Aedes aegypti* de los sectores El Cortijo y Botero.

Los valores de absorbancia para cada una de las enzimas se compararon con relación al punto de corte obtenido con la cepa Rockefeller de referencia para *Aedes aegypti* del laboratorio de entomología del Instituto Nacional de Salud.

El punto de corte de la cepa para las enzimas β esterasas fue de 0.408, para Citocromo P⁴⁵⁰ fue de 0.663 y para la Acetilcolinesterasa Inhibida con Propoxur de 0.01978.

En los resultados obtenidos se observa que el 23% de la población de *Aedes aegypti* del sector Cortijo presenta valores de absorbancia para β esterasas por encima del punto de corte (0.408). En el 77% de la población no se evidencia incremento en el nivel de las enzimas (Figura 7). Esto sugiere que las enzimas β esterasas no están actuando como mecanismo en la resistencia al organofosforado Temefós que se observa en población larval del insecto perteneciente a esta cepa.

Las cepas de *Aedes aegypti* de Botero muestra incrementos en la actividad de las enzimas β esterasas, el 66,6% de la población presenta valores de absorbancia para β esterasas por encima del punto de corte (Figura 8).

El incremento de estas enzimas es un mecanismo responsable de la resistencia a los insecticidas organofosforados y piretroides.

La distribución de la frecuencia de los valores de absorbancia obtenidos para las enzimas oxidasas de función múltiple (Citocromo P⁴⁵⁰) se muestra en las figuras 9-10. Las poblaciones evaluadas mostraron valores de absorbancia inferiores al punto de corte (0,663). Estos resultados confirman los obtenidos en los bioensayos, teniendo en cuenta que el incremento de las oxidasas de función múltiple confiere resistencia a los insecticidas piretroides.

Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas para la detección de la enzima Acetilcolinesterasa insensible, indican que las poblaciones del mosquito de los sectores estudiados no presentan alteraciones en la enzima, esto se refleja en los valores de absorbancia que son muy bajos, al igual que los de la cepa susceptible Rockefeller (figuras 11-12).

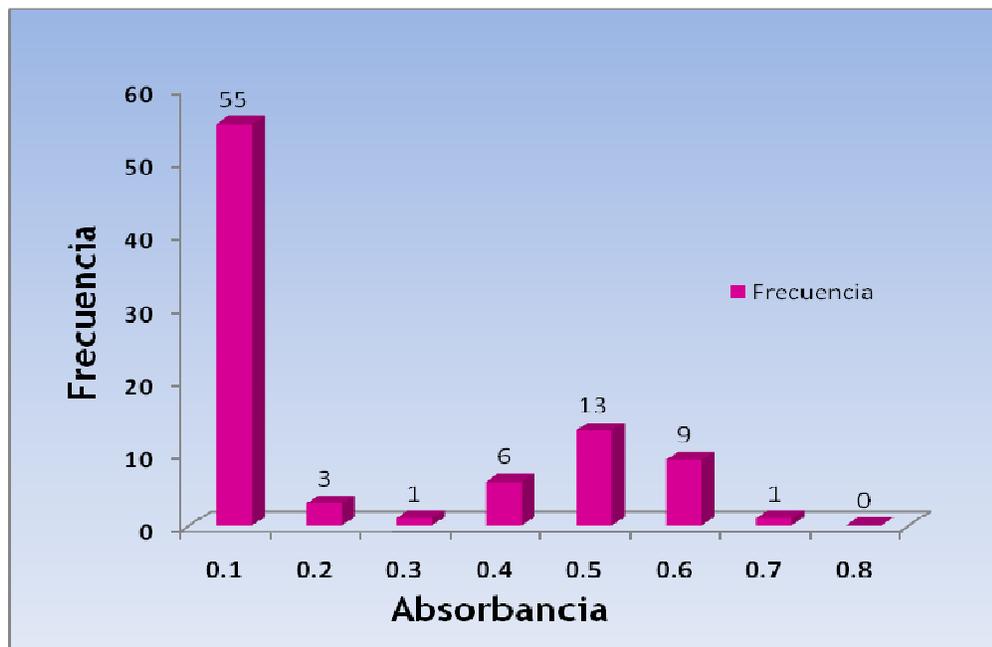


Figura 7. Valores de absorbancia para β esterasas de una cepa de *Aedes aegypti* del Sector El Cortijo.

Adsorbancia	Frecuencia
0.1	55
0.2	3
0.3	1
0.4	6
0.5	13
0.6	9
0.7	1
0.8	0

Tabla 5. Valores de absorbancia para β esterasas en la cepa El Cortijo.

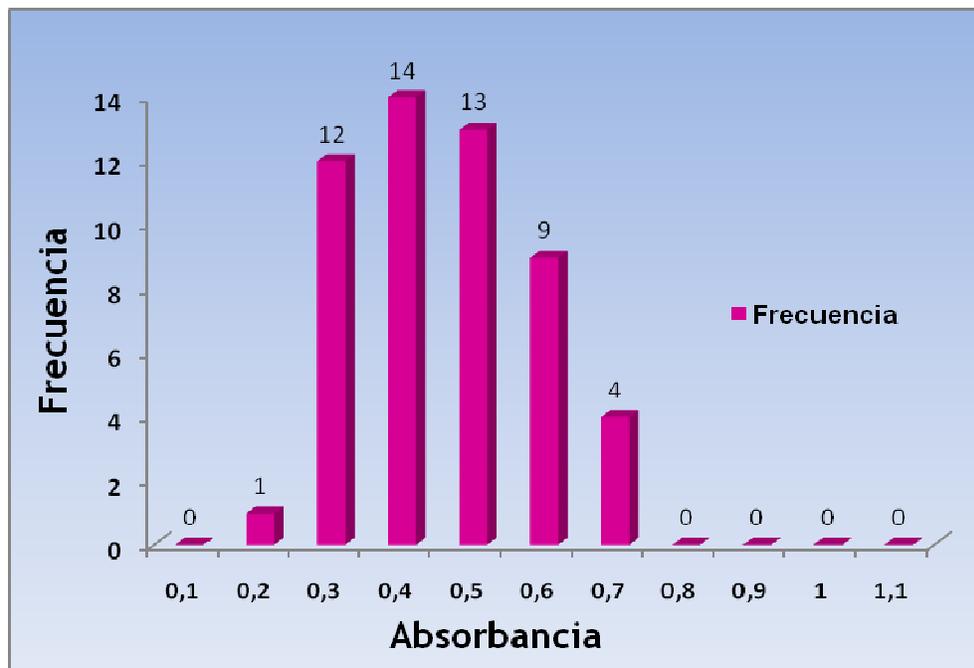


Figura 8. Valores de absorbancia para β esterasas de una cepa de *Aedes aegypti* del Sector Botero.

Adsorbancia	Frecuencia
0.1	0
0.2	1
0.3	12
0.4	14
0.5	13
0.6	9
0.7	4
0.8	0

Tabla 6. Valores de absorbancia para β esterasas en la cepa Botero.

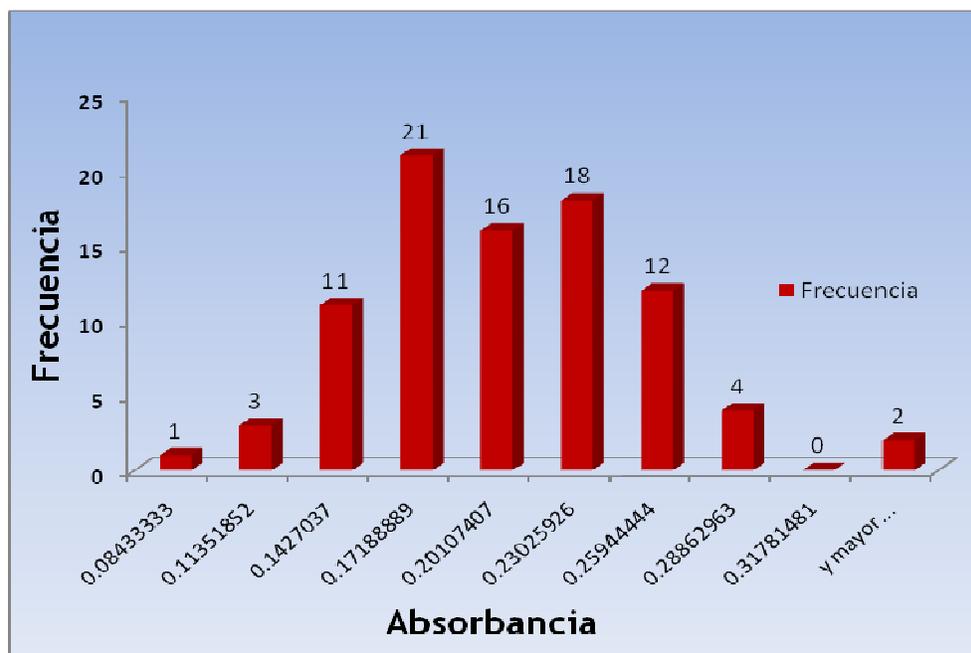


Figura 9. Valores de absorbancia para Oxidasas de Función Mixta en una cepa de *Aedes aegypti* del Sector El Cortijo.

Adsorbancia	Frecuencia
0.084	1
0.113	3
0.142	11
0.171	21
0.201	16
0.230	18
0.259	12
0.288	4
0.317	0

Tabla 7. Valores de absorbancia para Citocromo P450 en la cepa El Cortijo.

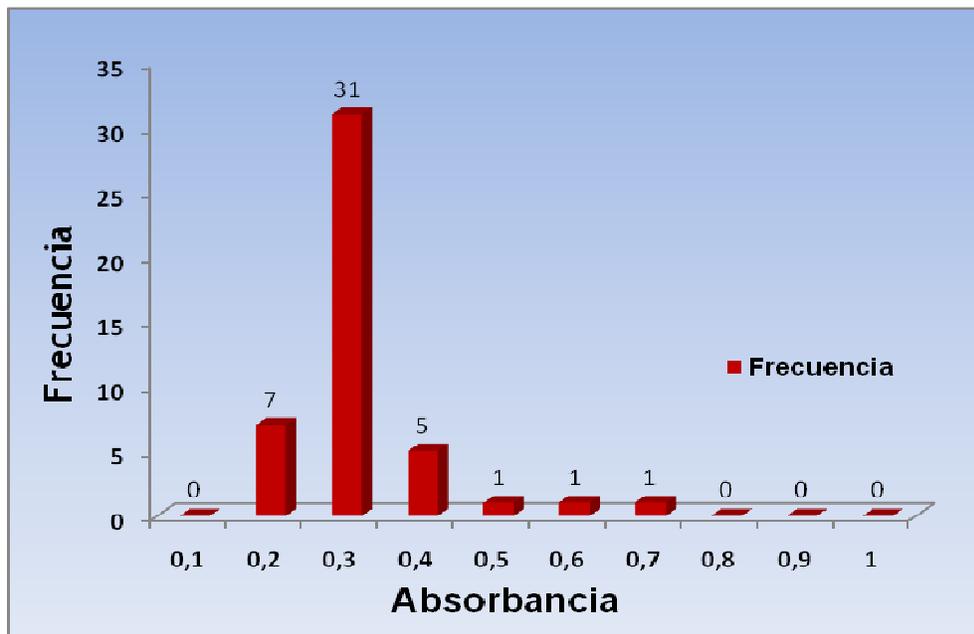


Figura 10. Valores de absorbancia para Oxidasas de Función Mixta en una cepa de *Aedes aegypti* del Sector Botero.

Adsorbancia	Frecuencia
0.1	0
0.2	7
0.3	31
0.4	5
0.5	1
0.6	1
0.7	1
0.8	0

Tabla 8. Valores de absorbancia para Citocromo P450 en la cepa Botero.

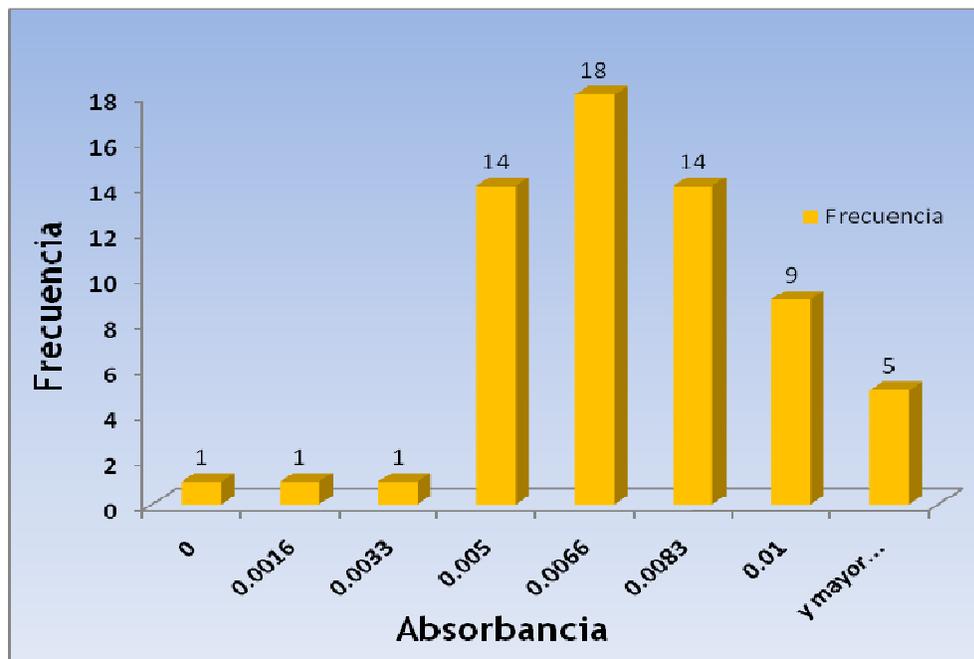


Figura 11. Valores de absorbancia para Acetilcolinesterasa Inhibida en una cepa de *Aedes aegypti* del sector El Cortijo.

Adsorbancia	Frecuencia
0	1
0.0016	1
0.0033	1
0.005	14
0.0066	18
0.0083	14
0.01	9
Mayor	5

Tabla 9. Valores de absorbancia para AChE Insensible en la cepa El Cortijo.

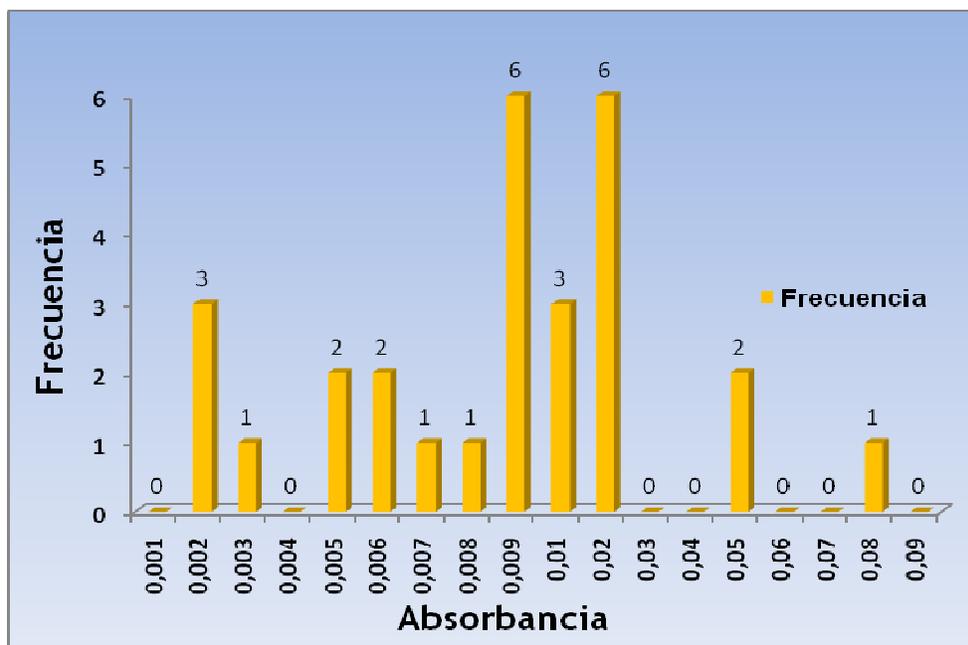


Figura 12. Valores de absorbancia para Acetilcolinesterasa Inhibida en una cepa de *Aedes aegypti* del sector Botero.

Adsorbancia	Frecuencia
0.001	0
0.002	3
0.003	1
0.004	0
0.005	2
0.006	2
0.007	1
0.008	1
0.009	6
0.01	3
0.02	6
0.03	0
0.04	0
0.05	2
0.06	0

Tabla 10. Valores de absorbancia para AChE Insensible en la cepa Botero.

6. DISCUSIÓN

Los insecticidas usados en Colombia para el control de epidemias de dengue y dengue hemorrágico transmitidas por *Aedes aegypti* son principalmente insecticidas organofosforados como Malatión contra los adultos y Temefós contra las fases larvianas. Estos insecticidas han sido históricamente utilizados en muchos países de América Latina y del mundo por su baja toxicidad en mamíferos y por su bajo costo comparado con otros insecticidas tales como los piretroides o carbamatos. Además el Temefós ha sido el insecticida recomendado por la Organización Mundial de la Salud para uso en agua potable.

Los bioensayos con la dosis diagnóstica de Temefós evaluada en larvas de *Aedes aegypti* de la ciudad de Sincelejo revelan porcentajes de mortalidad compatibles con resistencia al insecticida, esta resistencia puede ser atribuida a la continua presión de selección ejercida por este agente como resultado de las campañas de control de vectores por más de 20 años. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Mazarri *et al* 1995 en Venezuela, donde observaron moderados niveles de resistencia a Temefós en dos cepas colectadas en las localidades de Coro y Maracay³⁹. En el año 2003 se reportó resistencia al insecticida en un estudio realizado en varios municipios de Río de Janeiro, Brasil⁶⁸, también se observó una disminución de la susceptibilidad a este larvicida en un estudio realizado desde 1992 hasta 2002 en 15 poblaciones de *Aedes aegypti* del norte y centro de Italia⁶⁹. De igual forma en Colombia existen reportes de resistencia al químico en poblaciones de *Aedes aegypti* procedentes de Cartagena, Cali y Buga sometidas a un extenso uso del insecticida⁷⁰. *Aedes aegypti* es capaz de desarrollar altos niveles de resistencia a Temefós después de una intensa presión de selección en condiciones de laboratorio⁷¹.

De acuerdo a los criterios establecidos por la OMS, la población adulta de los sectores evaluados es resistente al organoclorado DDT, esta resistencia está muy distribuida en las especies de mosquitos de importancia médica. En 1947, tan solo un año después de la introducción de insecticidas para el control de vectores, se notificaron los primeros casos de resistencia a DDT en *Aedes taeniorhynchus* (Weidemann) y *Aedes sollicitans* (Walker) ⁷². Desde entonces se han señalado más de 100 especies de mosquitos resistentes a uno o más insecticidas ²¹, de las cuales 56 son Anophelinos y 39 Culicinos, además de triatominos, pulgas, piojos y garrapatas ⁷³. En Colombia, el amplio uso del DDT en áreas rurales maláricas por cerca de 35 años, puede explicar el que se haya encontrado niveles de supervivencia compatibles con resistencia en los insectos de las dos poblaciones evaluadas ⁷⁴. Existen registros de resistencia a DDT y Temefós en diferentes especies de *Anopheles* y *Aedes aegypti* en el país, los cuales sugieren que las poblaciones de vectores presentan características genéticas favorables para la emergencia de resistencia cuando éstas son presionadas por insecticidas ⁷⁵.

En esta investigación se evidencia susceptibilidad para Malatión y Fenitrotión en las poblaciones adultas de *Aedes aegypti* de Sincelejo, estos organofosforados son principalmente usados en situaciones de emergencia contra brotes de Dengue en el municipio. Es de resaltar que a pesar del uso intenso de Malatión en las campañas de control de *Aedes aegypti* en la región del Caribe por más de 25 años, existen pocos reportes de resistencia en el mosquito a este insecticida ^{12, 76-80}. No obstante, hay notables diferencias en cuanto a los niveles de resistencia a este insecticida y sus mecanismos en *Culex quinquefasciatus*, especie que también ha sido sometida a presión de selección con el insecticida Malatión en ambiente urbano ⁸¹. Algunos estudios muestran que la selección con Malatión en *Culex quinquefasciatus* por 22 generaciones incrementó la resistencia a 1208 veces ⁸². Mientras que, cepas de *Aedes aegypti* que han sido presionadas en el laboratorio con Malatión, se ha observado solo un incremento de 3 y 5 veces ^{83, 84} después de sucesivas generaciones de selección. Existe algún mecanismo, tanto

en condiciones de laboratorio como en el campo, que impide la evolución de la resistencia a este insecticida en *Aedes aegypti*, pero su uso extenso sí podría generar resistencia a otros insecticidas, los cuales son esenciales para el control de mosquitos⁸⁵.

La disminución de la susceptibilidad encontrada frente a los piretroides Lambdacyhalotrina y Deltametrina revela la importancia de que el estado de estos insecticidas sea continuamente vigilado por las entidades de control pertinentes ya que la emergencia de resistencia a estos plaguicidas puede aparecer con el tiempo, teniendo en cuenta ambas poblaciones del insecto son altamente resistentes al DDT y se ha reportado que existe el fenómeno de resistencia cruzada entre estos tipos de productos⁸⁶⁻⁹².

Además es importante monitorear permanentemente este estado de susceptibilidad a estos piretroides debido a que el uso de insecticidas por parte del público en general es considerado como uno de los principales factores que inducen presión de selección en insectos, y un amplio rango de insecticidas accesibles comercialmente tienen como ingrediente activo piretroides.

La sobreproducción de esterasas no específicas es el mecanismo involucrado en la resistencia a insecticidas organofosforados y carbamatos^{21, 30,56-57}. Sin embargo, en el presente estudio no existió consistencia entre el nivel de actividad de las enzimas β esterasas y la resistencia a Temefós en la cepa Cortijo ya que la población presenta bajos niveles de actividad enzimática, esto sugiere que dicho mecanismo no está implicado en la resistencia al insecticida. De igual forma, en la determinación del mecanismo de Acetilcolinesterasa Insensible en esta cepa no se observó la presencia de alteraciones en la enzima, por lo cual este mecanismo tampoco es el responsable de la resistencia al larvicida. De acuerdo a estos resultados, se sugiere una asociación entre enzimas glutatión – S – transferasas (GSTs) como posible mecanismo de resistencia para el larvicida Temefós en esta cepa de estudio⁹³⁻⁹⁴.

La resistencia a Temefós presente en la población de *Aedes aegypti* del sector Botero estuvo asociada al incremento de la actividad de β esterasas, esto concuerda con los resultados obtenidos en Estados Unidos⁷¹, Venezuela³⁹ y Trinidad⁹⁵. Por otra parte, se evidencia que no hay alteraciones en la enzima Acetilcolinesterasa presente en la población del insecto del sector Botero, por ello este mecanismo no es el responsable ni participa en la resistencia al Temefós.

En el caso de las oxidasas de función múltiple (Citocromo P⁴⁵⁰), las dos poblaciones presentaron bajos niveles de esta enzima, esto concuerda con los resultados de los bioensayos ya que estas cepas no son resistentes a los piretroides. Las oxidasas de función múltiple solas o en combinación con esterasas y glutatión-s-transferasas juegan un papel clave en la resistencia a insecticidas piretroides fundamentalmente^{21,30, 96-97}.

El mecanismo responsable de la resistencia a DDT en las cepas estudiadas no fue determinado, no obstante, se ha implicado a un grupo de Glutatión-S-Transferasas como mecanismo de resistencia a este insecticida, las bases moleculares de esta resistencia basada en glutatión-s-transferasas ha sido principalmente investigado en la mosca doméstica y en los mosquitos *Anopheles gambiae* y *Aedes aegypti*^{21,30,95-98}. Asimismo, existe otro mecanismo relacionado con la aparición de esta resistencia, es la insensibilidad en el sitio de acción de este insecticida, los canales dependientes de sodio en el sistema nervioso central del insecto, por causa de sustituciones como Leucina (Leu) por Fenilalanina (Phe) o Serina (Ser) en los genes que codifican las proteínas que forman el canal^{21, 30,98-100}.

7. CONCLUSIONES

La resistencia a Temefós desarrollada por la población de *Aedes aegypti* presente en los sectores El Cortijo y Botero de la ciudad de Sincelejo es una consecuencia directa del uso en gran escala de este insecticida organofosforado como larvicida contra los brotes de Dengue en el municipio.

Los insecticidas piretroides pueden ser utilizados como una opción por los programas de control de vectores en la ciudad de Sincelejo, siempre y cuando el estado de susceptibilidad/resistencia del mosquito *Aedes aegypti* frente a ellos sea periódicamente vigilado debido a que todas las poblaciones evaluadas mostraron una disminución de la susceptibilidad, al igual que resistencia al organoclorado DDT.

Las poblaciones de *Aedes aegypti* evaluadas de la ciudad de Sincelejo presentan alta susceptibilidad a los insecticidas organofosforados Malatión y Fenitrotión, lo que indica que estos insecticidas son opciones eficaces en las estrategias de los programas de control para disminuir la densidad del insecto y evitar así la propagación de la enfermedad.

Se confirma que el incremento en la actividad de las enzimas β esterasas están involucradas en la resistencia al organofosforado Temefós en las población de *Aedes aegypti* del sector Botero. Se evidencia la existencia de otro mecanismo que está causando la resistencia al mismo insecticida en la población de *Aedes aegypti* del sector El Cortijo.

Se demuestra que el mecanismo de Acetilcolinesterasa insensible no es responsable de la resistencia al insecticida Temefós en las poblaciones de *Aedes aegypti* de los sectores Cortijo y Botero.

8. RECOMENDACIONES

Se hace necesario continuar el monitoreo de la susceptibilidad a insecticidas en las poblaciones de *Aedes aegypti* de la ciudad de Sincelejo para brindar información fundamental que ayude a la toma de decisiones sobre el uso correcto de insecticidas.

Para el caso de las poblaciones *Aedes aegypti* de los sectores Cortijo y Botero, al detectarse resistencia al Temefós, es recomendable evaluar otras alternativas de control como peces larvívoros, Inhibidores de crecimiento ó agentes de control biológico como *Bacillus thuringiensis var. Israeliensis* que pudieran ser implementados en el control de las larvas de *Aedes aegypti*.

Se recomienda evaluar constantemente el estado de susceptibilidad de los piretroides para prolongar su vida útil por parte de los programas de control vectorial.

Implementar un sistema integrado en el manejo de vectores que incluya el uso alternativo de insecticidas organofosforados y piretroides en un sistema rotacional, aprovechando que tienen diferentes sitios de acción, de forma que retarde la aparición de resistencia.

Determinar el mecanismo bioquímico o molecular responsable de la resistencia al Insecticida DDT en las dos poblaciones de *Aedes aegypti* evaluadas en este estudio, al igual que el mecanismo involucrado en la resistencia al organofosforado Temefós en la cepa del Cortijo.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. M. Roberto Suarez, S. María Fernanda Olarte, M.F.A. Ana, U. Catalina Gonzalez. Is what I have just a cold or is it dengue? Addressing the gap between the politics of dengue control and daily life in Villavicencio-Colombia. *Social Science & Medicine* 61: 495–502 (2005).
2. G N Malavige, S Fernando, D J Fernando, S L Seneviratne. Dengue viral infections. *Postgrad. Méd. J.* 80; 588-601 (2004).
3. PAHO - Pan American Health Organization. Re-emergence of Dengue in the Americas. *Epidemiological Bulletin*; 18 (2) (1997).
4. PAHO - Pan American Health Organization. Dengue in the Americas: the epidemic of 2000. *Epidemiological Bulletin*; 21(4) (2000).
5. Rodhain F. The situation of dengue in the world. *Bull Soc Pathol Exot*; 89 (2): 87-90 (1996).
6. Gibbons RV, Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. *Clinical review. BMJ*; 321: 1563-1566 (2002).
7. Ministerio de Salud (Colombia). *Boletín Epidemiológico: Prevención y Control del Dengue* (2001).
8. Ministerio de Protección Social (Colombia). *Boletín Epidemiológico* (2007).

9. Dasssalud, Sucre. Boletín Epidemiológico (2006).
10. Yaleivys Buevas y Ana Escamilla. Tesis: Determinación de los serotipos del virus del Dengue circulantes en Sincelejo mediante la técnica RT – PCR. Universidad de Sucre (2004).
11. Bisset Juan. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. Rev Cuv Med Trop. 54(3): 202-219 (2002).
12. Rawlins C. Samuel, Joseph Ou Hing Wan. Resistance in some Caribbean populations of *Aedes Aegypti* to several insecticides. Journal of the American Mosquito Control Association, 11(1):59 – 65, (1995).
13. Bisset A. Juan *et al.* Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Aedes aegypti*. Rev. Cubana Med. Trop. 53(1): 37-43 (2001).
14. Chavéz G. Julio, Roldan R. Judith, Vargas V. Franklin. Niveles de resistencia a dos insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del Perú. Revista colombiana de entomología 31(1):75-78. (2005).
15. Rodríguez Maria Magdalena *et al.* Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba. Rev. Cubana Med. Trop. 51(2): 83-88 (1999).
16. Pereira L. José *et al.* Resistance of *Aedes Aegypti* to Organophosphates in Several Municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg, 68(3), pp. 329–333 (2003).
17. Bisset Juan, Rodriguez Maria, Díaz Cristina, Soca Lázaro. Caracterización de la resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides en *Culex*

quinquefasciatus del estado de Miranda, Venezuela. Rev. Cubana. Med. Trop. 51(2):89-94 (1999).

18. Bisset Juan, Rodríguez Maria, Cáceres Lorenzo. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en dos cepas de *Aedes Aegypti* de Panamá. Rev. Cubana Med. Trop. v. 55 n. 3 (2003).

19. Prieto Ayda V., Suárez Marco F., González Ranulfo. Susceptibilidad de dos poblaciones de *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) de Cali (Valle, Colombia) a Temephos y Triflumuron. Revista colombiana de entomología 28(2): 175-183 (2002).

20. Ocampo B. Clara and Wesson M. Dawn. Population dynamics of *Aedes aegypti* from a dengue hyperendemic urban setting in Colombia. Am. J. Trop. Med. Hyg., 71(4), pp. 506-513 (2004).

21. Heminingway Janet and Ranson Hilary. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. Annu. Rev. Emtomol 45: 371 – 391 (2000).

22. Dasssalud, Sucre. Boletín Epidemiológico (2006).

23. Rodríguez Morella, Marzal Miguel. Dengue: una revisión. Instituto de Biomedicina. UCV. Caracas, Venezuela (2004).

24. Hernán Velez *et al.* Enfermedades Infecciosas. Corporación Para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia (2003).

25. Carlos Yábarv. Rol de las proteínas no estructurales en los eventos de replicación del ARN del virus del Dengue. Rev Peru Med. Exp. Salud Pública. (2003).

26. Ríos Juan F. Aspectos entomológicos del dengue. Infectio Vol 8 – 3 (2004).
27. www.cenave.gob.mx/Dengue/default.asp?id=24.
28. Conde Osorio Andrea. Tesis: Estudio de la longevidad y el ciclo gonotrófico del *Aedes (stegomyia) aegypti* (Linneaus, 1972) cepa Girardot (Cudinamarca) en condiciones de laboratorio. Pontificia Universidad Javeriana (2003).
29. Jeffrey R. Bloomquist. Insecticidas: Características Químicas. Instituto politécnico y universidad del estado de Virginia (1996).
30. Janet Hemingway, Nicola J. Hawkes, Lynn McCarroll, Hilary Ranson. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochemistry and Molecular Biology 34 : 653–665 (2004).
31. Nauen Ralf. Insecticide Resistance in Disease vectors of Public Health Importance. Pest Manag Sci 63: 628 – 633 (2007).
32. Mazzarri Milena B. Revisión del estado actual de la resistencia de *Aedes Aegypti* a insecticidas utilizados en salud pública. Boletín de la dirección de malariología y saneamiento ambiental de Venezuela. Nº 2, Agosto – Diciembre (1995).
33. Georhiou GP. The magnitude of the resistance problem in pesticide resistance: strategies and tactics for management. Washington, DC. : national Academy Press (1986).
34. World Health Organization. Vector´s resistance to pesticides. Fifteenth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. Tech Rep Ser 818. Geneva: WHO: pp.1- 61 (1992).

35. Fonseca Idalyd, Quiñones P. Martha L., Vélez Iván D. Evaluación de la susceptibilidad de los principales vectores de Malaria y Dengue en Colombia, al organosforado pirimifos metil 0.1%. Revista Icoson.
36. Savero O.P. Eradication of the *Aedes aegypti* from the Americas. Mosq. News 16: 115-121 (1957).
37. Busvine J.R. & W.S. Coker. Resistance patterns in DDT-resistan *Aedes aegypti*. Bull.WHO. 18: 651-657 (1958).
38. Fox I. Resistance of *Aedes aegypti* to certain chlorinated hydrocarbon and organophosphorus insecticides in Puerto Rico. Bull. WHO 24: 489-94 (1967).
39. B. Mazarri Milene and P. Georghiou George. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate and pyrethroid insecticides in field population of *Aedes aegypti*. Venezuela. Journal of the American Mosquito Control Association, 11(3); 315-322. (1995).
40. Braga Ima, Pereira Lima José, Silva Soares Sidinei, Valle Denise. *Aedes aegypti*. Resistance to Temephos during 2001 in Several Municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 99. (2004).
41. Santacoloma L., Brochero HL., Chávez B. Estado de la susceptibilidad a insecticidas en *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) (Diptera: culicidae) en cinco departamentos de Colombia. Revista Biomédica: Memorias XIII congreso colombiano de parasitología y medicina tropical. Bogotá, D.C. (2007).
42. Orjuela U., Herrera M., Quintana N., Quiñones M. Estado de la susceptibilidad a insecticidas del mosquito *Aedes aegypti* en los departamentos de Chinchiná y La Dorada, Caldas. Revista Biomédica: Memorias XIII congreso colombiano de parasitología y medicina tropical. Bogotá, D.C. (2007).

43. Fonseca I., Bolaños D., Gómez W., Quiñones ML. Evaluación de la susceptibilidad a insecticidas del mosquito *Aedes aegypti* en el departamento de Antioquia. Revista Biomédica: Memorias XIII congreso colombiano de parasitología y medicina tropical. Bogotá, D.C. (2007).
44. Salazar M *et al.* Resistencia a insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti* y *Anopheles spp.* en los departamentos de Huila, Valle, Cauca y Nariño. Revista Biomédica: Memorias XIII congreso colombiano de parasitología y medicina tropical. Bogotá, D.C. (2007).
45. G. Brogdon William and C. McAllister Janet. Insecticide Resistance and Vector Control. Emerging Infectious Diseases Vol,4, October- December (1998).
46. B. Walsh Sinéad *et al.* Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. Biochemycal Society (2001).
47. Russell J. Robyn *et al.* Two major classes of target site insensitivity mutations confer resistance to organophosphate and carbamate insecticide. Pesticide Biochemistry and Physiology 79 :84-93 (2004).
48. Tan Jianguo *et al.* Identification of Amino Acid Residues in the Insect Sodium Channel Critical for Pyrethroid Bining. Mol Pharmacol 67: 513-522 (2005).
49. Vais Horia *et al.* Activation of Sodium Channel Promotes Modification by Deltamethrin. J. Gen. Physiol. Volumen 115 p. 305-318. (2000).
50. Lee Daewoo *et al.* Altered Properties of Neuronal Sodium Channel Associated with Genetic Resistance to Pyrethroids. Mol Pharmacology 55: 584-593 (1999).

51. Wang Sho.Ya, Barila Maria and Wang Kuo Ging. A Phenylalanine Residue at Segment D3-S6 in Nav1.4 Voltage- Gated Na⁺ Channels Is Critical for Pyrethroid Action. *Molecular Pharmacology* (2001).
52. Xu Qiang *et al.* Kdr Allelic Variation In Pyrethroid Resistant Mosquitoes, *Culex quinquefasciatus* (S). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345: 774-780 (2006).
53. Liu Nannan, Xu Qiang, Zhu Fang and Zhang Lee. Pyrethroid Resistance in Mosquitoes. *Insect Science* 13, 159-166 (2006).
54. Souderlun M. David *et al.* Molecular Neurobiology: Implications for Resistance Action and Resistance. *Pestic. Sci.* 26: 359-374 (1989).
55. Rodriguez-Saavedra K. *et al.* A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 16(6), 785-789 (2007).
56. Hemingway J. and Karunaratne S. H. P. P. Mosquitoes Carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Medical and Veterinary Entomology* 12: 1-12 (1998).
57. Hemingway Janet. The Molecular Basis of Two Contrasting Metabolic Mechanisms of Insecticide Resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 1009-1015 (2000).
58. Pasteur N. and Raymond M. Insecticide Resistance Genes in Mosquitoes: Their Mutations, Migrations, and Selection in Field Populations. *Journal of Heredity* 87: 444- 449 (1996).

59. Ranson Hilary *et al.* Evolution of Supergene Families Associated with Insecticide Resistance. Science Vol 298 (2002).
60. Vulule, J.M., Beach, R.F., Atieli, F.K., McAllister, J.C., Brogdon, W.G., Roberts, J.M., et al., 1999. Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. Med. Vet. Entomol. 13, 239–244.
61. Brogdon, W.G., McAllister, J.C., Corwin, A.M., Cordon-Rosales, C., 1999b. Independent selection of multiple mechanisms for pyrethroid resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). J. Econ. Entomol. 92, 298–302.
62. Resistencia de los Vectores de Enfermedades a los Plaguicidas. OMS, Ginebra (1992).
63. Brogdon G. William. Biochemical Resistance Detection: An Alternative to Bioassay. Parasitology Today (1989).
64. Dasssalud, Sucre. Boletín Epidemiológico (2006).
65. Milton E. Tinker. Claves para identificación de mosquitos que se crían en recipientes. OPS Unidad de *Aedes aegypti*.
66. Vidal Fonseca Mario, Insueta Pérez Omayda, Delgado Soca Alain. Dieta alimentaria de culícidos en el laboratorio. Boletín Epidemiológico Semanal. Instituto Pedro Kouri Pag: 369 (1999).
67. WWW.cdc.gov/.

68. Aparecida Braga *et al.* *Aedes aegypti* Resistance to Temephos during 2001 in Several Municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol 99(2): 199-203 (2004).
69. Romi R, Toma L, Severino F, Di Luca M. Susceptibility of Italian populations of *Aedes albopictus* to temephos and to other insecticides. *J Am Mosq Control Assoc* 19:419-23 (2003).
70. Morales Carlos & A. Suarez Marco. Resumen: Evaluación de la susceptibilidad de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) a Temefos en tres localidades de Colombia. XXV Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología SOCOLEN. Cali, Colombia.
71. Wirth MC, Georghiou GP. Selection and Caraterization of Temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. *J Am Mosq Control Assoc* 15: 315-20 (1999).
72. Brown, A.W.A. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2: 123-140 (1986).
73. Vector resistance to insecticides. 15 th Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. World Health Organ Tech Rep Ser 818, 818: 1- 62 (1992).
74. Quiñones L. Martha *et al.* Evaluación de la susceptibilidad de *Anopheles darlingi* A Lambda cyhalotrina (ICON) En Una Zona De Alta Transmisión Malárica En El Departamento De Antioquia (Colombia). *Revista Icosan*.

75. Fonseca Idalyd , Quiñones Martha L. Resistencia a insecticidas en mosquitos (Diptera: Culicidae): mecanismos, detección y vigilancia en salud pública. (Artículo de revision). Revista Colombiana de Entomología (2005).
76. Georghiou GP, Wirth M, Tran H, Saume F, Knudsen AB. Potential for organophosphate resistance in *Aedes aegypti* in the Caribbean area and neighboring countries. J Med Entomol 24:290-4 (1987).
77. Rawlins SC, Ragoonansingh R. Comparative organophosphorous insecticide susceptibility in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and *Toxorynchites moctezuma*. J Am Mosq Control Assoc 6:315-7.
78. Mekuria Y, Gwinn TA, Williams DC, Tidwell MA. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* from Santo Domingo, Dominican Republic. J Am Mosq Control Assoc 7: 69-72.
79. Thavaselvam D, Kumar A, Sumodan PK. Insecticide susceptibility of *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* in Panaji, Goa, Indian. J Malariol 7:69-72 (1993).
80. Rawlins SC. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. Pan Am J Public Health 4:243-51 (1998).
81. Rodríguez MM, Bisset JA, Molina D, Soca A. Malathion resistance in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* as a result of their use by the *Aedes aegypti* control programs. J Amer Mosq Control Ass 16(4):324-30 (2000).

82. Díaz C, Bisset J, Rodríguez MM. Selección de una cepa de *Culex quinquefasciatus* homocigótica para la resistencia al insecticida organofosforado Malatión. *Rev Cubana Med Trop* 45 (3) (1993).
83. Madhukar BVR, Pillai MKK. Development of organophosphorus resistance in Indian strains of *Aedes aegypti* (L.). *Bull WHO* 43:735-42 (1993).
84. Brown AWA, Abedi ZH. Cross-resistance characteristics of a malathion-tolerant strain developed in *Aedes aegypti*. *Mosq. News* 20:118-24 (1960).
85. Rodríguez María Magdalena, Bisset Juan A., Díaz Cristin. Resistencia cruzada a piretroides en *Aedes aegypti* de Cuba inducido por la selección con el insecticida organofosforado Malatión. *Rev Cubana Med Trop* 55(2):105-11 (2003).
86. C.Brengues *et al.* Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and Veterinary Entomology* 17, 84-94 (2003).
87. Rapeeporn Yaicharoen, Rachada Kiatfuengfoo, Theeraphap Chareonviriyaphap and Pornpimol Rongnoparut. Characterization of deltamethrin resistance in field populations of *Aedes aegypti* in Thailand. *Journal of Vector Ecology* June (2005).
88. Grant, D.F., E.C. Dietze, and B.D. Hammock. Glutathione – S - transferase isoenzyme in *Ae. aegypti*: purification, characterization, and isoenzyme-specific regulation. *Insect Biochem.* 21: 421-433 (1991).

89. Prapanthadara, L., J. Hemingway, and A.J. Ketterman. Partial purification and characterization of glutathione S-transferase involved in DDT resistance from mosquito *Anopheles gambiae*. *Pest. Biochem. Physiol.* 47: 119-133 (1993).
90. Mourya D.T., Gokhale M. D. & Mishra A. C. Biochemical basis of DDT – resistance in *Aedes aegypti* population from a dengue affected area in Shahjahanpur city. *Indian J Med Res* 99: pp 212-215 (1994).
91. Mourya D.T., Hemingway Hanet and J. Leake Colin. Changes in enzyme titres with age in four geographical strains of *Aedes aegypti* and their association with insecticide resistance. *Medical and Veterinary Entomology* 7, 11- 16 (1993).
92. Chareonviriyaphap Theeraphap *et al.* Biochemical detection of pyrethroid resistance mechanisms in *Anopheles minimus* in Thailandia. *Journal of vector Ecology* pp 108- 115 (2003).
93. Chiang, F., Sun, C.,. Glutathione transferase isozymes of diamondback moth larvae and their role in the degradation of some organophosphorus insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 45, 7–14 (1993).
94. Clark, A.G., Shamaan, N. A., Sinclair, M.D., Deuterman, W.C. Insecticide metabolism by multiple glutathione S – transferase in two strains of the house fly, *Musca domestica* (L). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 25, 169 – 175 (1989).
95. Vauhan ADR, Eferench – Constant RH. Biochemical monitoring of organophosphorus and carbamate insecticide resistance in *Ae. Aegypti* mosquitoes from Trinidad. *Med Vet Entomology* 12:318 – 21 (1998).
96. Chen YP, Sudderuddin Ki. Toxicological studies of insecticides on *Culex quinquefasciatus* Say and *Ae aegypti* (L.). *Southeast Asia J Trop Med Public Health* 9; 378-83 (1978).

97. Penilla Patricia *et al.* Cytochrome P⁴⁵⁰- based resistance mechanism and pyrethroid resistance in the field *Anopheles albimanus* resistance management trial. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 89: 111 – 117 (2007).
98. Fournier, D *et al.*, Insect Glutathione S – Transferases: Biochemical characteristic of the major form houseflies susceptible and resistant to insecticide. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 267 pp. 1840 – 1845 (1992).
99. McCarroll Lynn *et al.* Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 861 – 871 (2005).
100. Soderlund, D.M., Knipple, D.C., The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 33, 563–577 (2003).

10. ANEXOS

ANEXO 1

**FORMATO DE REGISTRO DE RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD EN LARVAS DE
Aedes aegypti A INSECTICIDAS.**

Departamento:

Localidad:

Fecha de la Prueba:

Responsable:

Tipo de Insecticida:

Insecticida:

Temperatura:

Humedad Relativa:

Concentración	Replica 1				Replica 2				Replica 3				Totales			
	Muertos	Pupas	Total	%	Muertos	Pupas	Total	%	Muertos	Pupas	Total	%	Muertos	Pupas	Total	%

OBSERVACIONES:

ANEXO 2

FORMATO DE REGISTRO DE RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD EN ADULTOS DE *Aedes aegypti* A INSECTICIDAS.

Departamento:

Localidad:

Fecha de la Prueba:

Responsable:

Tipo de Insecticida:

Insecticida:

Temperatura:

Humedad Relativa:

Tubo Nº	Individuos Expuestos	Mortalidad 1 hora	Mortalidad 24 horas	% Mortalidad	%Mortalidad Abbot
1					
2					
3					
4					
5					
6					
Control					

OBSERVACIONES:

ANEXO 3

FORMATO DE REGISTRO DE RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD EN ADULTOS DE *Aedes aegypti* A INSECTICIDAS PIRETROIDES.

Departamento:

Localidad:

Fecha de la Prueba:

Responsable:

Tipo de Insecticida:

Insecticida:

Temperatura:

Humedad Relativa:

Tubo Nº	Individuos Expuestos	Efecto Knockdown						% Recuperación	Mortalidad 24 horas	% Mortalidad	% M Abbot
		10	20	30	40	50	60				
1											
2											
3											
4											
Control											

ANEXO 4

NÚMERO DE CASAS A INSPECCIONAR EN UNA LOCALIDAD VIGILANCIA ENTOMOLÓGICA DE *Aedes aegypti*.

Número de casas en el conglomerado	Número mínimo de casas a inspeccionar
1 – 50	Todas las casas
51 – 100	50
101 – 200	75
201 – 300	120
301 – 401	150
400 – 500	171
501 – 1000	189
1001- 5000	231
5001 – 10000	285
➤ 10000	300

