

# SUSCEPTIBILIDAD DE LA LARVA DE *Aedes aegypti* A *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* EN TEGUCIGALPA, HONDURAS

*Susceptibility of the larva of Aedes aegypti to bacillus thuringiensis var israelensis in Tegucigalpa, Honduras*

Jovita Francia Ponce Guevara<sup>1</sup>, Brian M. Erazo<sup>2</sup>, Néstor J. Yanes<sup>3</sup>, Allison Y. Maradiaga<sup>3</sup>, Ammi Bustillo Ponce<sup>3</sup>, Ana Cruz<sup>3</sup>, Diego Varela<sup>3</sup>, Dyan C. Durón<sup>3</sup>, Kary Antúnez Williams<sup>3</sup>, Pedro Maradiaga<sup>3</sup>, Silvia Matute<sup>3</sup>, Stephany Sandoval<sup>3</sup>

<sup>1</sup>MD, MSc, Departamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias Médicas, UNAH.

<sup>2</sup>Estudiante de séptimo año de la carrera de medicina UNAH.

<sup>3</sup>Médico en Servicio Social UNAH

**RESUMEN. Introducción:** El dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos con la propagación más rápida en el mundo. En Honduras constituye un importante problema de salud pública debido a su alta incidencia. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bti) es un agente de control biológico aplicado en el control de vectores, se ha utilizado recientemente como parte de la estrategia contra el *Aedes aegypti* en Honduras. El presente estudio tiene como objetivo evaluar la susceptibilidad de la larva de *Ae. aegypti* a Bti en Tegucigalpa, Honduras para el año 2014. **Métodos:** Una muestra de 960 larvas de *Ae. aegypti* se recogieron de recipientes de almacenamiento en viviendas de las colonias La Cañada y Nueva Suyapa, ubicados en Tegucigalpa, Honduras. Los bioensayos se realizaron de acuerdo con las directrices emitidas por la Organización Mundial de la Salud y la Red Latinoamericana de Control de Vectores. Se llevaron a cabo 12 bioensayos por cada concentración estudiada. Se utilizaron cuatro concentraciones de Bti: 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2,5 mg/L y 5 mg/L. La mortalidad se registró a las 24 h. **Resultados:** Se encontraron valores de mortalidad larvaria de 98.734 % para la dosis de 0.5 mg/L; 99.375 % para 1 mg/L; 100 % para 2,5 mg/L y 100 % para 5 mg/l. **Conclusiones:** Bti ha probado ser efectivo contra las larvas de *Ae. aegypti*, se recomienda su evaluación sistemática y de manera periódica para mejorar su aplicación y posible desarrollo de resistencia.

Palabras claves: *Bacillus thuringiensis*, *Aedes*, Dengue, Control de Vectores.

## INTRODUCCIÓN

El mosquito *Aedes aegypti* es el principal vector responsable de la transmisión del dengue y la fiebre chikungunya, enfermedades virales que se extienden a gran velocidad.<sup>1,2</sup> La alta eficacia de *Aedes aegypti* como vector es atribuible en gran medida a sus marcados hábitos por las zonas urbanas y la gran abundancia de sitios de cría artificiales que ofrecen los ambientes humanos a estos mosquitos.<sup>3,4</sup> Acompañando a estas variables, el clima tropical y las características socioeconómicas precarias de Honduras crean un ambiente propicio para la reproducción de este vector.<sup>5,6</sup> Desde la entrada del virus del dengue al país hace más de 35 años, este mantiene un patrón epidemiológico de una circulación endémica combinada con brotes epidémicos que han ido en ascenso durante los últimos 15 años.<sup>7</sup> Aunado a este patrón de incidencia del dengue en constante aumento, se confirmó la entrada a Honduras del vi-

rus chikungunya en la segunda mitad del año 2014 y del virus zika en el año 2015, ambos patógenos son transmitidos por el mismo vector. Esto plantea nuevos desafíos para el sistema de salud según se invaden más zonas e infectan poblaciones nuevas para estas enfermedades, lo cual tiene como consecuencia grandes brotes.<sup>8</sup> Para el 2015, la Secretaría de Salud de Honduras reportó más de 43 mil casos de dengue y más de 80 mil de chikungunya.

El control de *Ae. aegypti* continúa siendo la única medida disponible hasta el momento para poder disminuir la transmisión de estas enfermedades.<sup>9</sup> La reducción de los criaderos y los programas de saneamiento ambiental son importantes componentes dentro de las estrategias trazadas, sin embargo, no han sido suficientes para el control de las poblaciones de este vector; por tal motivo durante los últimos 40 años, el control de los mosquitos se ha logrado acompañando estos esfuerzos con métodos químicos y más recientemente biológicos.<sup>10,11</sup> Dentro de los métodos se destaca el larvicida *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bti), una bacteria de ocurrencia natural formadora de esporas, que es el agente de control biológico más universalmente aplicado para el control de mosquitos.<sup>12</sup> El biolarvicida VectoBac WG® es un gránulo dispersable en agua sobre la base esporas de esta bacteria (Cepa AM65-52), que ha mostra-

Recibido 10/2017; Aceptado para publicación 11/2017.

**Dirección para correspondencia:** Correspondencia al: Dr. Brian Erazo Muñoz  
Correo electrónico: brianerazo7@gmail.com; brian.erazo@unah.hn

**Conflictos de interés.** Los autores declaramos no poseer conflictos de interés en relación a este artículo.

do alta eficacia contra *Ae. aegypti*.<sup>13</sup> El Bti fue introducido para su uso en Honduras desde el año 2012, a causa de los hallazgos divulgados por la Unidad de Entomología del Ministerio de Salud de alta resistencia al larvicida organofosforado temephos por parte de *Ae. aegypti* colectados en las regiones metropolitanas, fenómeno que ha sido observado a nivel de toda la región, causado por las constantes presiones a las cuales han sido sometidas las cepas de los mosquitos.<sup>14</sup>

Debido a esto, es necesario evaluar los productos químicos o biológicos a emplear de manera periódica y sistematizada para mejorar la toma de decisiones y los resultados de las estrategias para el control vectorial.<sup>15</sup> Para poder contribuir a esta estrategia, el presente estudio tiene como objetivo determinar la susceptibilidad de la larva de *Ae. Aegypti* al Bti en Tegucigalpa, Honduras para abril del año 2014.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Área de estudio:** La cepa de *Ae. aegypti* fue obtenida en las colonias Nueva Suyapa y La Cañada del Municipio del Distrito Central, departamento de Francisco Morazán, Honduras durante el mes de abril del 2014. Dichos sitios fueron seleccionados debido a los altos índices de infestación larvaria y de incidencia por dengue que han sido reportados históricamente según los datos recabados por la unidad epidemiológica de la región metropolitana.

**Recolección:** Las muestras de las larvas fueron obtenidas de recipientes de almacenamiento (pilas, baldes, barriles y tanques) con aguas tranquilas, ubicados bajo sombra y sin presencia de larvicidas en las viviendas de los barrios mencionados. Estas fueron transferidas a contenedores de 2 litros utilizando agua del mismo criadero para su transporte.

**Bioensayos:** Los bioensayos fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH) siguiendo los protocolos descritos por la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>16</sup> y la Red Latinoamericana de Control de Vectores.<sup>17</sup> Se preseleccionaron larvas de *Ae. aegypti* de tercer y cuarto estadio, estas fueron transferidas a contenedores de polipropileno de 25 x 25 cm x 7 cm de hondo. Se utilizó agua comercial purificada libre de cloro en estos recipientes. Se mantuvieron las larvas durante dos horas de esta manera para su climatización antes del tratamiento. Luego de la etapa de climatización se establecieron grupos de 20 larvas de estadios III y IV en vasos pequeños (3 oz) que contenían 25 ml de agua. No se ofreció alimentación adicional a las larvas durante este periodo.

Los bioensayos fueron realizados utilizando *Bacillus thuringiensis var israelensis* (Bti) – cepa AM 65-52, gránulos de dispersión en agua (VectoBac WG®) de 3.000 ITU/mg, utilizando cuatro concentraciones: [0.0005 g/L], [0.001 g/L], [0.0025 g/L] y [0.005 g/L]. Estas fueron seleccionadas por ser el rango de dosificación indicado por la OMS<sup>18</sup> y utilizado por el personal técnico de la Secretaría de Salud de Honduras. Todos los biolarvicidas fueron proporcionados por el Programa de Control del Dengue de la Secretaría de Salud y estaban dentro de su periodo de validez.

Se prepararon las concentraciones pipeteando 1 ml de solución estándar de Bti, justo sobre la superficie del agua en vasos descartables de 12 onzas preparados previamente con 224 ml de agua de clorada, esta se agitó vigorosamente por 30 segundos con una varilla de vidrio. Los controles fueron preparados por la adición de 1 ml de agua de clorada a cada vaso. Luego de 30 minutos de haber preparado la concentración, se añadieron las larvas de mosquitos contenidas en los vasos pequeños (3 oz). Se monitoreó periódicamente la temperatura y el pH en cada uno de los recipientes y bioensayos mediante un termómetro de inmersión (-10 a 100 C°) y tiras de pH. Se realizaron 8 réplicas y 4 controles por cada una de las 4 concentraciones estudiadas (48 bioensayos en total). Las larvas fueron manipuladas con pipetas descartables.

Las distintas concentraciones de Bti (0,5mg/L, 1 mg/L, 2.5mg/L y 5 mg/L) fueron pesadas en una balanza analítica con una especificidad de 0,00001 g, en el laboratorio de pesaje de la Facultad de Química y Farmacia de la UNAH. Las concentraciones fueron debidamente adaptadas a una concentración de 50 ml de solución acuosa.

Las lecturas de mortalidad se realizaron a las 24 horas. La recolección de datos en cada bioensayo fue realizada a ciegas. Las larvas se consideraron muertas cuando no reaccionaron al momento de ser tocadas con un puntero romo en la región cervical. Durante la realización del bioensayo se hizo el registro del número de larvas que empuparon.

**Análisis Estadístico:** Para el almacenamiento y análisis de los datos se utilizó el programa Microsoft Excel © 2013. Durante el bioensayo en el cual ninguna larva empupó se usó la ecuación de cálculo de porcentaje de mortalidad larvaria, calculando el número de larvas muertas sobre el número de larvas expuestas, durante los bioensayos en los cuales las larvas empuparon, se calculó la mortalidad en los bioensayos mediante una ecuación de mortalidad corregida. Para la corrección del porcentaje de mortalidad debido a muerte en los controles se utilizó la fórmula Abbott.<sup>19</sup>

**Consideraciones Éticas:** Se brindó toda la información necesaria a la población sobre el estudio, educación acerca del vector y se autorizó mediante un consentimiento informado en cada una de las propiedades donde se realizó colecta de larvas. Así también se eliminó todo el material biológico larvario de manera que no resultara un riesgo para el ecosistema.

## RESULTADOS

Las condiciones ambientales fueron adecuadas para el desarrollo del estudio, la temperatura ambiente se situó entre 24-28 C° con un promedio de 25.9 C°, SD ± 1.4. Para los bioensayos la temperatura del agua registrada fue entre 26-27 C° y de 26.1 C° promedio. El registro de pH fue de 7 en todos los recipientes y bioensayos. La mortalidad en los controles fue nula (n=0/320), por lo que no se utilizó la fórmula Abbott para ajustar la mortalidad. No se descartó ningún bioensayo por registro de número elevado de pupas (>10%) y/o contaminación.

Se encontró susceptibilidad de la larva de *Ae. Aegypti* en todas las concentraciones utilizadas de *Bti*. Con un porcentaje

de mortalidad de 98.734 % (n=156/158) para la concentración de 0.5 mg/L; 99.375 % (n=159/160) de mortalidad para la concentración de 1 mg/L; 100 % (n=158/158) de mortalidad para la concentración de 2.5 mg/L y 100 % (n=159/159) de mortalidad para la concentración 5 mg/L.

## DISCUSIÓN

Según la interpretación de los parámetros de susceptibilidad indicados por la OMS<sup>16</sup> que dictan que el diagnóstico positivo de susceptibilidad se confirma al tener un porcentaje de mortalidad larvaria entre 98 a 100%, se encontró susceptibilidad a todas las concentraciones (0.5 – 5 mg/L) de *Bacillus thuringiensis var israelensis* VectoBac WG® contra las larvas de *Ae. aegypti* de estadio III y IV en Tegucigalpa, Honduras para Abril del año 2014. Esto coincide con la historia de uso de dicho larvicida en nuestro medio, las larvas han sido expuestas a la presión de este producto de manera reciente, por lo que aún no hay indicios de desarrollo de resistencia.<sup>20</sup> Por otro lado, para la concentración de 0.5 mg/L el valor de mortalidad producido fue de un patrón acorde con los resultados actuales de la OMS que manifiesta que la CL90 se da a una concentración de 0.49 mg/dl.<sup>21</sup>

No hay investigaciones anteriores publicadas sobre la susceptibilidad o resistencia de la presentación de *Bacillus thuringiensis var israelensis* utilizada en este estudio en Honduras. En La Habana, Cuba se han obtenido resultados de alta susceptibilidad de *Ae. Aegypti* a Bti aún luego de 5 años después de su aplicación intensiva.<sup>15,22</sup> Resultados similares se han obtenido en Brasil, donde poblaciones expuestas a este agente por más de 10 años aún muestran susceptibilidad.<sup>24</sup> En otras especies de vectores como *Aedes albopictus* también se ha evidenciado alta susceptibilidad a Bti.<sup>25</sup> Aunque se han reportado altos niveles de resistencia a Bti para otras especies de culicidos como *Culex*.<sup>26</sup>

*Bti* se presenta como una alternativa atractiva para el control de *Ae. aegypti* por sus claras ventajas sobre insecticidas químicos, a saber: alta especificidad, inocuidad sobre el medio ambiente y lento desarrollo de resistencia.<sup>27</sup>

Los resultados presentados sugieren que la aplicación de *Bti* constituye una alternativa para como parte del control de *Ae. Aegypti* en Tegucigalpa. Recomendamos realizar estudios periódicos sobre la susceptibilidad de la larva de *Ae. aegypti* a *Bti* para verificar su efectividad a través del tiempo y poder detectar de manera temprana cualquier tipo de disminución en su efecto y con esto poder realizar ajustes y tomar mejores decisiones en la estrategia de control del vector. Así mismo limitar el uso del control químico con temephos que ha demostrado tener desventajas por la resistencia que desarrollan las especies larvarias de *Aedes* a este producto.<sup>28</sup> Por último, recomendamos que los insecticidas no tienen que ser la pieza fundamental en la estrategia de prevención primaria de las enfermedades vectoriales, sino parte de una estrategia integral que incluye la educación de la población, la limpieza del ambiente comunitario, una normativa, políticas públicas claras y el mejoramiento de los determinantes sociales de la salud principalmente el acceso al agua.

**Agradecimientos.** A la Unidad de Entomología de la Secretaría de Salud por su asesoría en aspectos técnicos, a los técnicos de la Región Metropolitana de la Secretaría de Salud por su apoyo durante el proceso de recolección y ejecución del diseño del estudio. A la Facultad de Química y Farmacia de la UNAH por el préstamo de insumos y al Departamento de Ciencias Fisiológicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNAH por facilitar las instalaciones de sus laboratorios.

**Conflictos de Interés.** Los autores de este trabajo declaramos que no tenemos ningún conflicto de interés en relación a este trabajo de investigación. Declaramos que hemos tenido pleno acceso a todos los datos en este estudio y asumimos toda la responsabilidad por la integridad de los datos y la exactitud de los análisis de los mismos.

## REFERENCIAS

- Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne A, Shearer FM, Brady OJ, et al. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. *Sci Data*. 2015;2:150035.
- Vega-Rua A, Zouache K, Girod R, Failloux AB, Lourenco-de-Oliveira R. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *J Virol*. 2014 Jun; 88(11): 6294-6306
- Day JF, Edman JD, Scott TW. Reproductive fitness and survivorship of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) maintained on blood, with field observations from Thailand. *J Med Entomol*. 1994 Jul; 31(4):611-7
- Gubler DJ. Dengue, urbanization and globalization: the unholy trinity of the 21(st) century. *Trop Med Health*. 2011;39(4 Suppl):3-11.
- Fuentes-Vallejo M, Higuera-Mendieta DR, García-Betancourt T, Alcalá-Espinosa LA, García-Sánchez D, Munévar-Cagigas DA, et al. Territorial analysis of *Aedes aegypti* distribution in two Colombian cities: a choromatic and ecosystem approach. *Cad Saúde Pública*. 2015; 31(3): 517-530.
- Chang AY, Fuller DO, Carrasquillo O, Beier JC. Social Justice, Climate Change, and Dengue. *Health and Human Rights Journal* 2014;16(1):93-104.
- Avila Montes GA, Araujo R, Orellana Herrera G. Situación Epidemiológica del Dengue en Honduras Período 1991-2010. *Rev Méd Hondur*. 2010;78(3):156-162.
- Staples JE, Fischer M. Chikungunya virus in the Americas--what a vector-borne pathogen can do. *N Engl J Med*. 2014 Sep; 371(10):887-9
- Rodríguez MM, Bisset JA., Pérez Omayda, Montada D, Moya M, Yanelys R, et al. Estado de la resistencia a insecticidas y sus mecanismos en *Aedes aegypti* en el municipio Boyeros. *Rev Cubana Med Trop* 2009 ; 61(2).
- Montada-Dorta D, Castex-Rodríguez M, Suárez-Delgado Silvia, Figueredo Sánchez D, Leyva Silva M. Estado de la resistencia a insecticidas en adultos del mosquito *Aedes aegypti* del municipio Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. *Rev Cubana Med Trop*. 2005; 57( 2 ):125-132.
- World Health Organization. Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee: Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition 2009. Geneva: WHO; 2009.
- Becker N. Microbial control of mosquitoes vectors. 1st Asian Congress of Parasitology and Tropical Medicine & 40 th Annual Scientific Seminar of MSPTM. Symposium 10: Bti/Bsp, March 2004; p. 80.
- Corbillón CO, González A, Menéndez Z, Companioni A, Bruzón RY, Díaz M, et al. Influencia de factores bióticos sobre la eficacia de *Bacillus thuringiensis var. israelensis* contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev Cubana Med Trop*. 2012; 64( ): 235-243.
- Rodríguez MM, Bisset JA, Fernandez D. Levels of insecticide resistance

- and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American countries. *J Am Mosq Control Assoc.* 2007;23(4):420-9.
15. Menéndez Z, Rodríguez J, Gato R, Companioni A, Díaz M, Bruzón RY. Susceptibilidad de cepas de *Aedes aegypti* a *Bacillus thuringiensis* var. israelensis en La Habana. *Rev Cubana Med Trop.* 2012; 64(3): 324-329
  16. World Health Organization. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. WHO/VBC 1981:806-7. Ginebra: WHO; 1981.
  17. Bisset J, Blanco S, Braga I, Coto H, Masuh H, Moncayo A, et al. Protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas de mosquitos de la especie *Aedes aegypti*. Documento propuesto por la Red Latinoamericana de Control de Vectores. Iguazú: Fundación Mundo Sano; 2005.
  18. World Health Organization. WHOPES-recommended compounds and formulations for control of mosquito larvae. Report of the Whopes Working Group Meeting September 2012. Geneva: WHO; 2012.
  19. Abbott WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol.* 1925;18(1):265-266.
  20. Ferré J, Van Rie J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Ann Rev Entomol.* 2002;47:501-33.
  21. World Health Organization. Report Of The Seventh Whopes Working Group Meeting Who/Hq, Review of: Vectobac Wg Permanet Gokilaht-S 5ec World Health Organization Communicable Disease Control, Prevention and Eradication Who Pesticide Evaluation Scheme (Whopes). Geneva: WHO; 2003.
  22. Gato R, Díaz M, Bruzón R, González A, Hernández Y, García I. Estudio de resistencia de *Aedes aegypti* a *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. *Rev Cubana Med Trop.* 2008;60(1):74-7.
  23. Araújo AP, Araujo DF, Helvecio E, Arruda de Barros R, Fontes de Oliveira C, Junqueira Ayres C, et al. The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis* israelensis: a basis for management. *Parasites and Vectors.* 2013; 6:297.
  24. Ahmad M, Asmalia ML, Wan FZ. Susceptibility of *Aedes albopictus* from dengue outbreak areas to temephos and *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2016; 6(4):295-300.
  25. Paul A, Harrington LC, Zhang L, Scott JG. Insecticides resistance in *Culex pipiens* from New York. *J Am Mosq Control Assoc.* 2005;21(3):305-9.
  26. Ochoa G, Arrivillaga J. *Bacillus thuringiensis*: Avances y perspectivas en el control biológico de *Aedes aegypti*. *Bol Mal Salud Amb.* 2009;49( 2 ):181-191.
  27. Diniz MMCSL, Henriques ADS, Leandro RS, Aguiar DL, Beserra EB. Resistance of *Aedes aegypti* to temephos and adaptive disadvantages. *Rev Saude Publica.* 2014; 48(5): 775-782.

**SUMMARY. Introduction:** Dengue is the viral disease transmitted by mosquitoes with the fastest spread in the world. In Honduras currently constitutes a major public health problem due to its high incidence. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bti) is a biocontrol agent applied in vector control, it has been recently used as one of the strategies against *Aedes aegypti* in Honduras. The purpose of this study was to determine the susceptibility of *Ae. Aegypti* to *Bti* in Tegucigalpa, Honduras during 2014. **Methods:** A sample of 960 larvae of *Ae. aegypti* collected from containers in houses of La Cañada and Nueva Suyapa neighborhoods, located in Tegucigalpa, Honduras, were used. Bioassays were conducted according to the guidelines issued by the World Health Organization and the Latinoamerican Network for Vector Control. Twelve bioassays were carried out for each concentration used. **Results:** Four concentrations of Bti were analyzed: 0.5 mg/L, 1 mg/L, 2.5 mg/L and 5 mg/L. Larval mortality was recorded at 24 h. Larval mortality was estimated, 98.734 % for the dose of 0.5mg/L; 99.375 % for 1 mg/L; 100 % for 2.5 mg/L and 100 % for 5 mg/l. **Conclusions:** Bti has been proven to be effective against *Ae. aegypti* larvae, evaluation of this product have to be carried out systematically and periodically to ensure better results and prevent resistance development.

**Keywords:** Dengue, *Bacillus thuringiensis*, *Aedes*, Vector Control.