

MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS INSECTICIDAS EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* EN MEXICO

✉ Azael Che-Mendoza¹, Yamili Contreras-Perera², Valentín Uc-Puc², Edgar Koyoc-Cardena², Felipe Dzul-Manzanilla², Pablo Manrique-Saide².

¹Vector Biology Department, Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool L3 5QA, UK

²Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida C.P. 97000, México.

³Servicios de Salud del Estado de Guerrero, Chilpancingo C. P. 39090 México.

✉ Correo: chedoza@liverpool.ac.uk

RESUMEN: Para determinar los mecanismos de resistencia a los insecticidas en *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) en dos ciudades endémicas a dengue bajo constante presión de selección con insecticidas, se colectaron muestras (colectas de huevos) durante la estación de lluvias de 2012 en Mérida y Acapulco, fueron analizadas mediante bioensayos de susceptibilidad (pruebas de botellas CDC), pruebas bioquímicas y moleculares. Los resultados sugieren que los elevados niveles de resistencia a piretroides observados, están asociados a una elevada actividad de las oxidasas y a la presencia de mutaciones kdr (1016I y 1534C). Particularmente encontramos una elevada intensidad de resistencia a la permetrina. A excepción de algunos puntos de la ciudad de Mérida, todas las poblaciones evaluadas fueron totalmente susceptibles a propoxur y clorpirifos. Considerando los múltiples mecanismos que confieren elevada resistencia a piretroides, es recomendable mantener el monitoreo de las poblaciones para el desarrollo de una estrategia de manejo de resistencia adecuada.

Palabras claves: *Aedes aegypti*, resistencia a insecticida, mutación kdr.

Insecticide resistance mechanisms in *Aedes aegypti* populations from Mexico.

ABSTRACT: To gain a more comprehensive understanding of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) insecticide resistance in two dengue-endemic cities under constant insecticide selection pressure, *Ae. aegypti* (eggs collections) were collected during rainy season of 2012 in Merida and Acapulco and were analysed using bioassays (CDC bottle tests), biochemical assays and molecular assays for kdr detection. Results suggest that both elevated oxidase activity and kdr mutations (1016I and 1534C) are contributing to the high levels of pyrethroid resistance observed in Merida and Acapulco. Particularly we found an elevated intensity of resistance for permethrin. Mosquito populations from Acapulco were fully susceptible to propoxur and chlorpyrifos. Given the high level of resistance to pyrethroids and multiple resistance mechanisms, monitoring incipient resistance to propoxur and chlorpyrifos detected in some foci of Merida is recommendable for an adequate strategy for insecticide resistance management.

Key words: *Aedes aegypti*, insecticide resistance, kdr mutation

INTRODUCCIÓN

El dengue es un problema importante de salud pública en México. Por más de diez años (1999-2010) las actividades de control vectorial del dengue realizadas, se basaron exclusivamente en el uso de insecticidas a base de permetrina. Como resultado, el desarrollo de la resistencia a la permetrina en *Aedes aegypti* se extendió en varias regiones del país (Flores *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2009; Ponce-García *et al.*, 2009; Siller *et al.*, 2011; Aponte *et al.*, 2013; Saavedra-Rodríguez *et al.*, 2014). Como consecuencia algunos estados del país han optado por el uso de los carbamatos y organofosforados como los insecticidas de elección para el control de los vectores del dengue.

El desarrollo e implementación de I) medidas efectivas de control de vectores basadas en evidencia; y II) estrategias de manejo de la resistencia, se han señalado como prioridades para el Programa Nacional de control de dengue (Norma Oficial Mexicana, 2011). Ante esta perspectiva, se realizó un estudio sobre el estado de la susceptibilidad y los mecanismos de resistencia a los principales insecticidas (grupos químicos) actualmente utilizados por el Programa Nacional de control del dengue en poblaciones de *Ae. aegypti* de Mérida, Yucatán y Acapulco, Guerrero.

MATERIALES Y MÉTODO

Localidades de muestreo. Este estudio se llevó a cabo en la ciudad de Mérida, ubicada en la península de Yucatán, en el sureste de México (20° 45 'y 21° 15' Norte, 89° 30 'y 89° 45' Oeste) y en la zona de Ciudad Renacimiento de Acapulco, situado en el Estado de Guerrero (17 ° 36 'Norte, 99 ° 57' oeste) a lo largo de la costa del Pacífico de México (Figura 1).

Material biológico. Se colectaron huevos de *Ae. aegypti* mediante ovitrampas desplegadas en ambos sitios de estudio, Mérida (21 áreas) y Ciudad Renacimiento, Acapulco (2 áreas) durante la mitad y al final de la temporada de lluvias de 2012 (julio-septiembre y agosto-noviembre de 2012 respectivamente) (Figura 1). Bajo condiciones de insectario (en Unidad de Bioensayos Entomológicos de la Universidad Autónoma de Yucatán –UCBE/UADY) se criaron y emergieron hembras adultas F1 de 1-3 días de edad. Las cepas de Nueva Orleans y Rockefeller de *Ae. aegypti* fueron proporcionados por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta, EE.UU. para ser utilizados como cepas susceptibles de referencia para todos los ensayos.

Bioensayos. Para los bioensayos de susceptibilidad se usó el método de botellas CDC (CDC, 2010). Se usaron botellas Wheaton impregnadas con la dosis diagnóstico de cada insecticida diluido en 1 ml de acetona: permetrina 15 mg / ml, α -cipermetrina 10 mg / ml, propoxur 12,5 mg / ml y clorpirifos 14 mg / ml. Se usaron 10-15 mosquitos hembras de 1-3 días de edad por botella, en 4 réplicas (botellas) y un control (botella conteniendo solo acetona) por insecticida. El efecto caída (KD) de los mosquitos se registró en el tiempo diagnóstico de 30 minutos. Después de 2 h de exposición, los mosquitos fueron transferidos a vasos de recuperación para observar la mortalidad a las 24 h. Se evaluó la intensidad de la resistencia a los piretroides para aquellas poblaciones que mostraron resistencia (KD <90%) a la dosis diagnóstico del insecticida probado. La intensidad de la resistencia se evaluó utilizando botellas CDC (cuatro réplicas y un control por dosis) tratados con dosis seriadas de 2x, 5x y 10x, la dosis diagnóstica de cada insecticida.

Pruebas bioquímicas. Se emergieron mosquitos hembras F1 de un día de edad de huevos obtenidos de una submuestra de las áreas de estudio (10 de Mérida y 2 de Ciudad Renacimiento) y se almacenaron a -70 ° C. Lotes de 30 mosquitos hembras por área de estudio se homogeneizaron individualmente en 100 μ l 0,01 M de tampón KPO₄ (pH 7,2), y después se diluyó a 2 ml con el mismo tampón. Alícuotas de 100 μ l, por triplicado, se transfirieron a placas de microtitulación de 96 pozos. Los ensayos bioquímicos se realizaron según Brogdon y McAllister (1997, 1998) para evaluar la actividad de las oxidasas, esterasas, glutation-S-transferasas [GST]) y la insensibilidad de la acetilcolinesterasa. El límite superior del rango de las absorbancia obtenido de la cepa susceptible Rockefeller se usó como el umbral de resistencia. Los ensayos bioquímicos se realizaron en el laboratorio de Entomología de la CDC (Atlanta, EE.UU.).

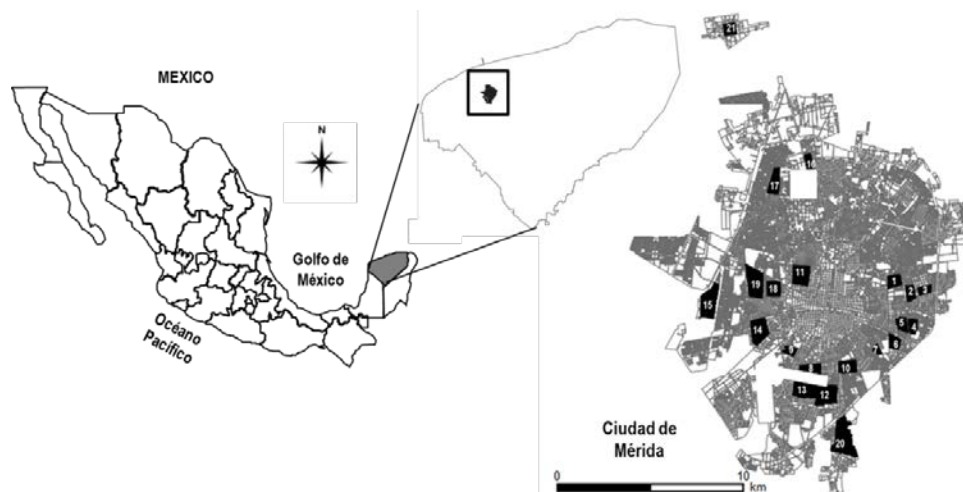


Figura 1. Ubicación del sitio de estudio. Se muestran las áreas de las colonias donde se realizaron las colectas con ovitrampas. 1. Manuel A. Camacho; 2. Pacabtun; 3. Fidel V.; 4. Vergel III; 5. Vergel II; 6. San A. Kahua; 7. U.H. Morelos; 8. Castilla C.; 9. Manzana 115; 10. Cinco C.; 11. Centro; 12. San J. Tecoh; 13. San A. Xluch; 14. Mulsay; 15. Juan Pablo II; 16. Cordemex; 17. Francisco M.; 18. Bojorquez; 19. Yucalpeten; 20. Plan de A. Sur

Pruebas moleculares. Se extrajo el ADN del 10% de los mosquitos que fueron clasificados como sobrevivientes y muertos a la dosis diagnóstico de la permetrina después de 24 h en los bioensayos de botellas CDC. Se siguieron los protocolos descritos por Saavedra-Rodríguez *et al.* (2007) y Yanola *et al.* (2011) para identificar las mutaciones *kdr* V1016I (n=117 mosquitos) y F1534C (n=103 mosquitos) respectivamente. La cepa MF5 (Cepa de Mérida que posee ambas mutaciones *kdr*, recientemente establecida en el laboratorio de Entomología de CDC Atlanta, EE.UU.) se utilizó como control positivo *kdr* y la cepa Rockefeller se utilizó como control negativo *kdr*.

Análisis de datos. Los resultados de KD fueron clasificados de acuerdo a los criterios definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2013): 98-100% indica susceptibilidad; 90-97% sugiere desarrollo de resistencia; menos de 90% indica resistencia. Se calculó el tiempo después del cual el 50% de los mosquitos fueron derribados (KDT50) y sus intervalos de confianza del 95% (IC) mediante un análisis Probit. La proporción de resistencia KDT50 (RRKDT50) se calculó dividiendo el KDT50 de cada población por el KDT50 de la cepa de susceptible Nueva Orleans. En los ensayos bioquímicos se realizó una ANOVA ($\alpha=0.05$) para determinar si existían diferencias significativas en la actividad enzimáticas de las poblaciones con respecto a la cepa susceptible. Se usó el coeficiente de correlación de Spearman (*rs*) para evaluar la relación entre la actividad de la enzima y la supervivencia en bioensayo de susceptibilidad. Las frecuencias alélicas de las mutaciones I1016 y c1534 se calcularon utilizando la siguiente ecuación: $(N \text{ heterocigotos}) + 2(n \text{ homocigotos}) / 2$ (total n mosquitos analizadas). Se realizó una prueba exacta de Fisher ($\alpha = 0,05$) para probar la asociación de cada mutación con la supervivencia bioensayo.

RESULTADOS

Bioensayos. Los bioensayos mostraron altos niveles de resistencia KD, principalmente a la permetrina, la RRKDT50 varió de 0.8 a 13.9 veces para Mérida, y 3.3 a 5.7 veces para Acapulco, pero también a la α -cipermetrina, RRKDT50 de 1.1 a 5.5 veces para Mérida, y 1.7 a 2.2 veces para Acapulco (Cuadro 1). Todas las poblaciones evaluadas fueron susceptibles al propoxur y

clorpirifos (100% KD a los 30 minutos), a excepción de algunas áreas de Mérida que mostraron indicios de susceptibilidad reducida.

Cuadro 1. Susceptibilidad a piretroides en *Ae. aegypti* en Mérida y Acapulco. Se muestra la media del porcentaje de knockdown a los 30 min (KD) y sus respectivos errores estándar (EE), el tiempo después del cual el 50% de los mosquitos fueron derribados (KDT₅₀) y sus respectivos intervalos de confianza al 95% (I.C.) y la razón de resistencia knockdown (RRKD₅₀).

| Permethrin (15 µg/mL) | KD | | TKD ₅₀ | | | RRKDT ₅₀ |
|--------------------------|------|------|-------------------|-----------|--------|---------------------|
| | % | EE | Minutos | 95 % I.C. | | |
| MÉRIDA | | | | | | |
| Mulsay | 100 | 0 | 7.6 | (5.7, | 10.0) | 0.8 |
| San A. Xluch | 97.5 | 2.5 | 9.8 | (7.6, | 12.4) | 1.1 |
| San A. Kahua | 71.8 | 6.2 | 19 | (15.7, | 22.9) | 2.1 |
| Centro | 70 | 4.1 | 19.5 | (16.1, | 23.6) | 2.2 |
| San J. Tecoh | 60 | 9.1 | 25.8 | (21.6, | 30.8) | 2.9 |
| Plan de A. | 50 | 18.3 | 38.3 | (32.3, | 45.5) | 4.3 |
| Manuel A. Camach | 42.2 | 13.4 | 32.6 | (27.6, | 38.5) | 3.7 |
| Vergel II | 41.1 | 10.9 | 37.8 | (31.6, | 45.1) | 4.2 |
| Bojorquez | 37.5 | 10.3 | 38.2 | (32.1, | 45.6) | 4.3 |
| Fidel V. | 32.5 | 20.2 | 44.7 | (37.5, | 53.3) | 5 |
| Yucalpeten | 31.4 | 9.7 | 54.7 | (45.8, | 65.7) | 6.1 |
| Dzitya | 30 | 7.1 | 47.1 | (39.6, | 56.3) | 5.3 |
| Francisco M. | 29.8 | 5.9 | 35 | (29.6, | 41.5) | 3.9 |
| Castilla C. | 29.7 | 10.6 | 45 | (39.6, | 51.2) | 5.1 |
| Pacabtun | 25 | 6.5 | 44.2 | (37.1, | 52.8) | 5 |
| Cinco C. | 20 | 9.1 | 47.2 | (39.5, | 56.5) | 5.3 |
| U.H. Morelos | 19 | 3.6 | 54.2 | (47.7, | 61.9) | 6.1 |
| Vergel III | 15 | 2.9 | 48.6 | (40.5, | 58.4) | 5.5 |
| Manzana 115 | 14.3 | 2.8 | 74.9 | (61.5, | 91.9) | 8.4 |
| Juan Pablo II | 12.5 | 4.8 | 47.8 | (39.8, | 57.5) | 5.4 |
| Cordemex | 2.5 | 2.5 | 124.1 | (93.6, | 166.7) | 13.9 |
| Susceptible | 100 | 0 | 8.9 | (6.9, | 11.5) | 1 |
| ACAPULCO | | | | | | |
| ACA01 | 12.5 | 6.3 | 55.1 | (44.8, | 71.3)* | 5.7 |
| ACA02 | 35 | 2.9 | 32.3 | (26.4, | 39.5)* | 3.4 |
| Susceptible | 100 | 0 | 9.63 | (6.63, | 12.9) | 1 |

| α-Cypermethrin (10 µg/mL) | KD | | KDT ₅₀ | | | RRKDT ₅₀ |
|------------------------------|------|------|-------------------|-----------|--------|---------------------|
| | % | EE | Minutos | 95 % I.C. | | |
| MÉRIDA | | | | | | |
| Centro | 100 | 0 | 4.8 | (2.9, | 7.7) | 1.1 |
| Mulsay | 100 | 0 | 5.7 | (3.6, | 8.8) | 1.3 |
| Dzitya | 100 | 0 | 6.5 | (4.2, | 9.6) | 1.5 |
| Cinco C. | 100 | 0 | 6.6 | (4.3, | 9.8) | 1.5 |
| Plan de A. | 100 | 0 | 7.2 | (4.9, | 10.3) | 1.6 |
| Francisco M. | 100 | 0 | 7.2 | (4.7, | 10.7) | 1.7 |
| San J. Tecoh | 100 | 0 | 7.2 | (4.7, | 10.8) | 1.7 |
| U.H. Morelos | 100 | 0 | 8.1 | (6.0, | 10.7) | 1.9 |
| Manzana 115 | 100 | 0 | 10.5 | (7.3, | 14.7) | 2.4 |
| San A. Xluch | 100 | 0 | 12 | (8.5, | 16.5) | 2.8 |
| Pacabtun | 97.5 | 2.5 | 5.4 | (3.4, | 8.4) | 1.2 |
| Castilla C. | 97.5 | 2.5 | 8.5 | (6.3, | 11.2) | 2 |
| Vergel III | 95 | 2.9 | 10.6 | (7.2, | 15.0) | 2.4 |
| Cordemex | 88.1 | 6.9 | 12 | (9.2, | 15.3) | 2.7 |
| Juan Pablo II | 87.5 | 7.5 | 6 | (3.9, | 9.0) | 1.4 |
| Manuel A. Camach | 85 | 6.5 | 18.1 | (13.1, | 24.7) | 4.1 |
| Vergel II | 85 | 2.9 | 22.3 | (16.2, | 30.4) | 5.1 |
| Fidel V. | 82.5 | 11.8 | 5.9 | (3.8, | 8.8) | 1.4 |
| Bojorquez | 80.7 | 10.9 | 14.1 | (10.2, | 19.0) | 3.2 |
| San A. Kahua | 74.4 | 10.3 | 8.6 | (5.8, | 12.4) | 2 |
| Yucalpeten | 70 | 20.4 | 23.8 | (17.5, | 32.2) | 5.5 |
| Susceptible | 100 | 0 | 4.4 | (2.5, | 7.2) | 1 |
| ACAPULCO | | | | | | |
| ACA01 | 93.2 | 4.4 | 8.6 | (6.2, | 10.7)* | 2.2 |
| ACA02 | 100 | 0 | 6.7 | (4.7, | 8.7)* | 1.7 |
| Susceptible | 100 | 0 | 3.9 | (2.3, | 5.8) | 1 |

En relación a la intensidad de la resistencia a la permetrina, la mayoría de los sitios en Mérida alcanzó KD superior al 90% (umbral de resistencia) sólo cuando se expusieron a 5 veces la dosis de diagnóstico (Figura 2). Sólo un sitio (Bojórquez) requirió 10 veces la dosis diagnóstico. En Acapulco un sitio requirió 5 veces la dosis de diagnóstico para alcanzar > 90% KD (1x = 35%, 2x = 72.5%, 5x = 92.5%), mientras que la exposición a 5 veces la dosis diagnóstico en el otro sitio sólo alcanzado > 70 % KD (1x = 12.5%, 2x = 45%, 5x = 75%).

La intensidad de la resistencia a la α-cipermetrina fue menor que la observada para la permetrina (Figura 2). El 57% (12/21) de los sitios en Mérida mostraron susceptibilidad (≥98% KD) a la dosis diagnóstico. Las áreas restantes requirieron 2 veces la dosis diagnóstica para alcanzar > 90% KD (con las excepciones de Vergel II y Bojórquez, donde no se obtuvieron un número suficiente de mosquitos). En Acapulco, la dosis de diagnóstico de α-cipermetrina fue suficiente para alcanzar mortalidades del 93%-100%.

Pruebas bioquímicas. A excepción de dos sitios de Mérida (Francisco de Montejó y Vergel III), ninguna de las áreas evaluadas de Mérida y Acapulco mostró niveles significativamente elevados de actividad de esterasa. Se detectó una elevación significativa de la actividad de la oxidasa y GST en el 63% (7/11) de los sitios muestreados en Mérida y en ambos

sitios en Acapulco. Sin embargo sólo la frecuencia de las absorbancias de las oxidasas se correlacionó significativamente ($\alpha = 0.05$) con el aumento observado en KDT50 para la permetrina ($r_s = 0,894$, $y = 301.92x - 235,31$, $P = 0,02$) para las poblaciones de Mérida. Los resultados sugieren que la acetilcolinesterasa insensible no está presente en la mayoría de las poblaciones. Sin embargo, un sitio en Mérida (Cordemex) mostró un nivel significativamente más alto de actividad AChE.

Pruebas moleculares. Ambas mutaciones *kdr* 1016I y 1534C estuvieron presentes en frecuencias altas (82% y 94-100%, respectivamente, en los dos sitios de estudio). La frecuencia 1016I se asoció positivamente con la supervivencia permetrina (prueba exacta de Fisher $p = 0,014$).

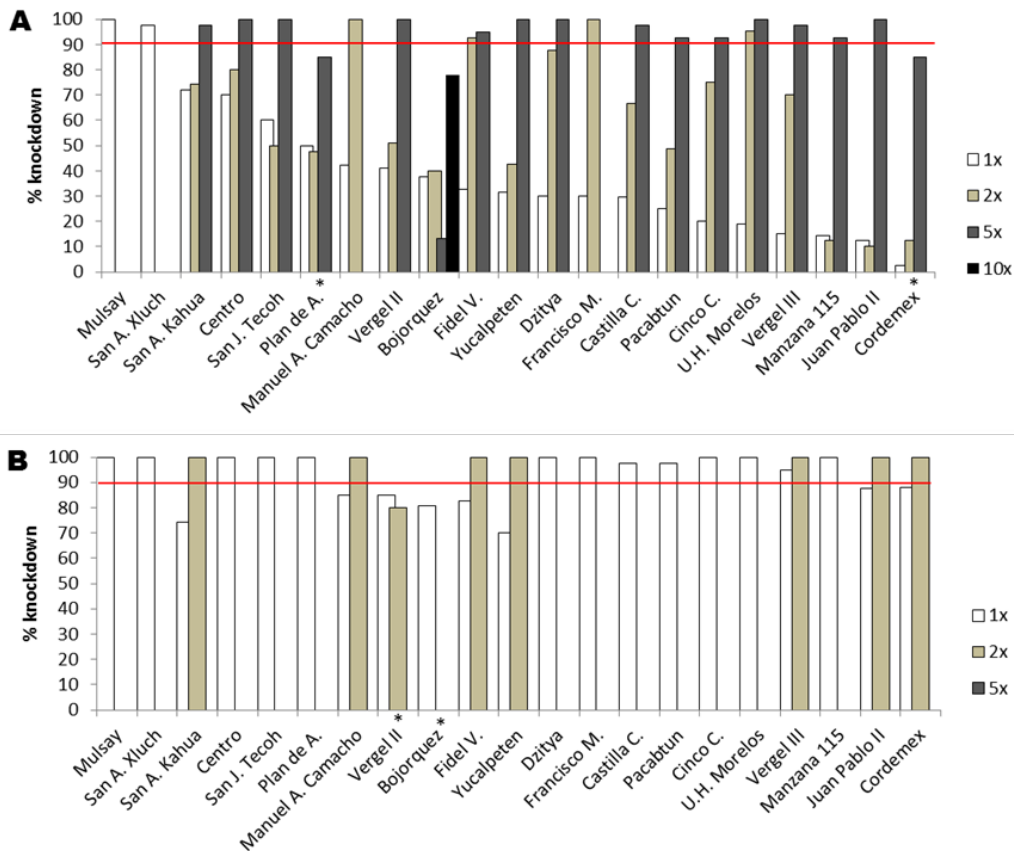


Figura 2. Intensidad resistencia (1x-10x) a la permetrina (A) y α -cipermetrina (B) en poblaciones de *Aedes aegypti* de Mérida durante la temporada de lluvias de 2012. *Sitios donde no se obtuvo suficientes hembras para continuar con los bioensayos.

DISCUSIÓN Y CONCLUSION

Las poblaciones de *Ae. aegypti* evaluadas en el presente estudio mostraron un alto grado de resistencia a los piretroides, principalmente permetrina, asociado a una elevada actividad de las oxidasas y la presencia de mutaciones *kdr*. Estudios previos en México que datan de 2005 reportan una elevada resistencia a este piretroide asociado principalmente a elevados niveles de esterasas (Flores *et al.* 2005, 2006, 2009) y la presencia de mutaciones *kdr* (Saavedra *et al.*

. 2007; Ponce-García *et al.*, 2009). En nuestro estudio observamos elevados niveles de actividad GST y oxidasas, sin embargo sólo se observó una correlación positiva entre la actividad de las oxidasas y la resistencia a la permetrina. Las GST están asociadas a la resistencia

metabólica del DDT (Hemingway, 2000) y aunque no se evaluó el estado de la susceptibilidad a este insecticida, debemos considerar que la persistencia del DDT en el ambiente puede estar ejerciendo una presión de selección sobre las poblaciones de mosquitos. Es de llamar la atención la elevada intensidad de resistencia observada para la permetrina, a pesar que este insecticida dejó de usarse desde hace 2-3 años antes de la realización de este estudio. Flores *et al.* (2013) observó diferentes niveles de intensidad de resistencia a la permetrina y a la α -cipermetrina en varias localidades vecinas del estado de Veracruz, estimando que se requeriría incrementar hasta 2 veces o más la concentración de estos insecticidas para derribar y eventualmente matar a los mosquitos. Sin embargo, a pesar del alto grado de resistencia a la permetrina, en este estudio se observó susceptibilidad a la α -cipermetrina en la mayoría de las poblaciones, lo cual confirma que la resistencia a un piretroide no significa que la susceptibilidad se ha perdido a todos los piretroides. La persistencia de la resistencia a la permetrina después de varios años de no emplearse en Salud Pública, justifica el uso de grupos químicos de acción diferente a los piretroides, tal como son los carbamatos y organofosforados. Considerando los múltiples mecanismos que confieren elevada resistencia a piretroides, es recomendable mantener el monitoreo de las poblaciones para el desarrollo de una estrategia de manejo de resistencia adecuada.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyectos GUE-2008-02-108686 y SALUD-2011-1-161551 FOMIX-CONACYT Mexico); al UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) (proyecto “Innovative Community Based Ecosystem Management Interventions for Improved Dengue Prevention in Mexico”) por su apoyo financiero; al Entomology Branch of the Division of Parasitic Diseases and Malaria de CDC, Atlanta, USA y a la UCBE-UADY Mérida, México por las facilidades otorgadas para el uso del laboratorio e insectario.

LITERATURA CITADA

- Aponte HA, Patricia Penilla R, Dzul Manzanilla F, Che Mendoza A, López AD, Solís F, Manrique-Saide P, Ranson H, Lenhart A, McCall PJ, Rodríguez AD. 2013. The pyrethroid resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* from the Guerrero state, Mexico. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107: 226–234.
- Brogdon WG, McAllister JC. 1998. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time- mortality determinations in bottles. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 14:159–164.
- Brogdon WG, McAllister JC, Vulule J. 1997. Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 13 (3):233–237.
- Flores A, Albeldaño-Vásquez W, Fernández-Salas I, Badii M, Loaiza-Becerra H, Ponce-García G, Lozano-Fuentes S, Brogdon W, Black W, Beaty B. 2005. Elevated α -esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, México. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 82: 66-78.
- Flores A, Grajales J, Fernández-Salas I, Ponce G, Loaiza M, Lozano S, Brogdon WG, Black IV W, Beaty B. 2006. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L) from Quintana Roo, southern Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association* 22:672-677.

- Flores AE, Ponce G, Silva BG, Gutierrez SM, Bobadilla C, Lopez B, Mercado R, Black IV WC. 2013. Wide spread cross resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Veracruz state Mexico. *Journal of economic entomology* 106 (2):959-969.
- Flores AE, Reyes G, Fernandez-Salas I, Sanchez FJ, Garcia GP. 2009. Resistance to permethrin in *Aedes aegypti* (L.) in Northern Mexico, *Southwestern Entomologist* 34: 167–177.
- Hemingway J. 2000. Mini review: The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30:1009-1015.
- Norma Oficial Mexicana. 2011. NOM-032-SSA2-2010 para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector D.O.F. 6th July 2011.
- OMS. 2013. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. WHO. Genova. 30 p.
- Ponce-García GP, Flores AE, Fernández-Salas I, Saavedra-Rodríguez K, Reyes-Solis G, Lozano-Fuentes S, Guillermo Bond J, Casas-Martínez M, Ramsey JM, García-Rejón J, Domínguez-Galera M, Ranson H, Hemingway J, Eisen L, Black IV WC. 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in México. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13;3(10):e531.
- Saavedra-Rodríguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Salas I, Bisset J, Rodriguez M, Mccall PJ, Donnelly MJ, Ranson H, Hemingway J, Black IV WC. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 16: 785–798.
- Saavedra-Rodríguez K, Beaty M, Lozano-Fuentes S, Denham S, Garcia-Rejon J, Reyes-Solis G, Machain-Williams C, Loroño-Pino MA, Flores-Suarez A, Ponce-Garcia G, Beaty B, Eisen L, Black IV WC. 2014. Local evolution of pyrethroid resistance offsets gene flow among *Aedes aegypti* collections in Yucatan state, Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. In press.
- Siller Q, Ponce G, Lozano S, Flores AE. 2011. Update on the frequency of Ile1016 mutation in voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* in Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association* 27: 357-362.
- Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Somwang W, PrapanthadaraL. 2011. High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. *Tropical Medicine & International Health* 16: 501–509.