

Susceptibilidad a organofosforados e identificación de mecanismos de resistencia en poblaciones de *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) de los municipios de Ayapel y Planeta Rica (Córdoba, Colombia)

Estudiante:

Yerson Javier García Leal

Cod. 2022220546422

Trabajo de Investigación presentado como requisito para optar el título de: Magister en Genética.

Tutor(es):

Paula Ximena Pareja Loaiza

Tutora interna

María Claudia Atencia Pineda

Tutora externa

RESUMEN

El dengue es una enfermedad de interés en salud pública para el departamento de Córdoba. Para su control, se han usado los insecticidas como principal estrategia dirigidas al mosquito vector *Aedes aegypti*; sin embargo, la presión de selección con insecticidas sobre el vector ha originado resistencia a organofosforados y piretroides, registrada en los municipios de Pueblo Nuevo, de San Bernardo del Viento y Montería, y la identificación en las poblaciones de *Ae. aegypti* en este último municipio de mutaciones *kdr* y alteración de enzimas como mecanismos de resistencia. Para las demás poblaciones del departamento se desconoce el estado de la susceptibilidad a estos insecticidas aplicados para el control, así como no se

cuenta con información que documente la existencia de mutaciones en el gen Ace-1 para Colombia como un posible mecanismo de resistencia. Evaluamos el estado actual de la susceptibilidad a organofosforados y los mecanismos de resistencia enzimáticos y en sitio blanco de acción en poblaciones de *Ae. aegypti* de los municipios de Ayapel y Planeta Rica. Se realizaron bioensayos de susceptibilidad a dosis diagnóstica para temefos siguiendo la metodología de la Organización Mundial de la Salud (OMS); malatión, fenitrotion y pirimifos metil siguiendo la metodología del Centro para la Prevención y Control de Enfermedades (CDC). En las poblaciones de *Ae. aegypti* donde se registró resistencia, se determinó la intensidad de la resistencia. Se realizó búsqueda de mutaciones en el gen Ace-1 y finalmente, se identificaron los niveles de glutatión s-transferasas, α -esterasas, \square -esterasas, oxidasas de función mixta y acetilcolinesterasa insensible. Se encontró susceptibilidad a temefos, malatión y pirimifos metil; baja y alta intensidad de resistencia a fenitrotión para las poblaciones de Ayapel y Planeta Rica, respectivamente. Esta resistencia se encontró relacionada con la alteración enzimática, para α -esterasa, β -esterasa, GST e iAChE. Además, se identificó una mutación sinónima (C108T), la cual no está relacionada a la resistencia a organofosforados. La información obtenida resulta útil para el fortalecimiento de las políticas públicas en el control vectorial recomendando así, el uso de los organofosforados temefos, malation y pirimifosmetil como estrategia de prevención de futuras epidemias de Dengue, Zika y Chikunguya en Ayapel y Planeta Rica.

Palabras clave: Culicidae, *Aedes aegypti*, organofosforados, mecanismos de resistencia.

ABSTRACT

Dengue is a disease of public health concern in the department of Córdoba. For its control, insecticides have been used as the main strategy directed to the mosquito vector *Aedes aegypti*; however, the selection pressure with insecticides on the vector has originated resistance to organophosphates and pyrethroids, registered in the municipalities of Pueblo Nuevo, San Bernardo del Viento and Montería, and the identification in the populations of *Ae. aegypti* in the latter municipality of kdr mutations and enzyme alteration as resistance mechanisms. For the other populations in the department, the status of susceptibility to these insecticides applied for control is unknown, and there is no information documenting the existence of mutations in the Ace-1 gene for Colombia as a possible mechanism of resistance. We evaluated the current status of susceptibility to organophosphates and enzymatic and target site resistance mechanisms in *Ae. aegypti* populations in the municipalities of Ayapel and Planeta Rica. Susceptibility bioassays were performed at diagnostic doses for temephos following the methodology of the World Health Organization (WHO); malathion, fenitrothion and pirimiphos methyl following the methodology of the Center for Disease Control and Prevention (CDC). In *Ae. aegypti* populations where resistance was recorded, the intensity of resistance was determined. A search for mutations in the Ace-1 gene was carried out and finally, the levels of glutathione S-Transferases, α -esterase, β -esterase, mixed function oxidases and insensitive acetylcholinesterase were identified. Susceptibility to temephos, malathion and pirimiphos methyl; low and high intensity of resistance to fenitrothion was found for the Ayapel and Planeta Rica populations, respectively. This resistance was found to be related to enzymatic alteration, for α -esterase, β -esterase, GST and iAChE. In addition, a synonymous mutation (C108T) was identified, which is not related to organophosphate resistance. The information obtained is useful for the strengthening of

public policies in vector control, thus recommending the use of the organophosphates temephos, malathion and pirimiphosmethyl as a strategy for the prevention of future epidemics of Dengue, Zika and Chikungunya in Ayapel and Planeta Rica.

Key words: Culicidae, *Aedes aegypti*, organophosphates, resistance mechanisms.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ruiz-López F, González-Mazo A, Vélez-Mira A, Gómez GF, Zuleta L, Uribe S, et al. Presencia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) y su infección natural con el virus del dengue en alturas no registradas para Colombia. *Biomédica*. 2016;36(2):303-8.
2. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA). Estadísticas de Vigilancia Rutinaria año 2020. 2024. Available from: <https://portalsivigila.ins.gov.co/Paginas/Vigilancia-Rutinaria.aspx>
3. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA). Estadísticas de Vigilancia Rutinaria año 2021. 2024. Available from: <https://portalsivigila.ins.gov.co/Paginas/Vigilancia-Rutinaria.aspx>
4. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA). Estadísticas de Vigilancia Rutinaria año 2022. 2024. Available from: <https://portalsivigila.ins.gov.co/Paginas/Vigilancia-Rutinaria.aspx>
5. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA). Estadísticas de Vigilancia Rutinaria año 2023. 2024. Available from: <https://portalsivigila.ins.gov.co/Paginas/Vigilancia-Rutinaria.aspx>

6. Zaim M, Guillet P. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends Parasitol.* 2002 Apr;18(4):161-3. doi: 10.1016/s1471-4922(01)02220-6. PMID: 11998703.
7. Najera A, Zaim M. Malaria vector control. Decision making criteria and procedures for judicious use of insecticides. World Health Organization, 2003;1-106. Available from:http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/67365/WHO_CDS_WHOPES_2002.5_Rev.1.pdf;jsessionid=2B95C0sequence=1.
8. Bisset J. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Rev Cubana Med Trop.* 2002;54(3):202-19.
9. Motta Sánchez A, Tonn RJ, Uribe L., Calheiros LB. Comparación de la eficacia de varios métodos de aplicación de insecticidas para el control o la erradicación del *Aedes aegypti* en Colombia 1978. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)*;84(1),ene. 1978. *Bol Oficina Sanit Panamá.*84(1):24-37.
10. Santacoloma L, Chaves B, Brochero HL. Estado de la susceptibilidad de poblaciones naturales del vector del dengue a insecticidas en trece localidades de Colombia *Biomédica*, vol. 32, núm. 3, septiembre, 2012, pp. 333-343 Instituto Nacional de Salud Bogotá, Colombia
11. Maestre Serrano, R., y Gómez Camargo, D. Dengue: epidemiología, políticas públicas y resistencia de vectores a insecticidas. *Revista Ciencias Biomédicas.* 2020;4(2):302–317. <https://doi.org/10.32997/rcb-2013-2826>
12. Atencia MC, Pérez M de J, Jaramillo MC, Caldera SM, Cochero S, Bejarano EE. First report of the F1534C mutation associated with cross-resistance to DDT and pyrethroids in *Aedes aegypti* from Colombia. *Biomedica.* 2016;36(3):432–7. pmid:27869391

13. Aguirre-Obando OA, Dalla Bona AC, Duque L JE, Navarro-Silva MA. Insecticide resistance and genetic variability in natural populations of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Colombia. *Zoologia*. 2015;32(1):14– 22.
14. Pareja-Loaiza PX, Santacoloma Varon L, Rey Vega G, Gómez-Camargo D, Maestre-Serrano R, Lenhart A. Mechanisms associated with pyrethroid resistance in populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from the Caribbean coast of Colombia. *PLoS One*. 2020; 6:15(10):e0228695. doi: 10.1371/journal.pone.0228695. PMID: 33022007; PMCID: PMC7537870.
15. Anaya Y, Cochero S, Rey G, Santacoloma L. Evaluación de la susceptibilidad a insecticidas en *Aedes aegypti* capturados en Sincelejo. *Memorias XIII Congreso colombiano de parasitología y medicina tropical. Biomédica*. 2007;27(2): 257.
16. Fonseca I, Bolaños D, Gómez W, Quiñones M. Evaluación de la susceptibilidad de larvas de *Aedes aegypti* a insecticidas en el departamento de Antioquia. *Memorias XIII Congreso colombiano de parasitología y medicina tropical. Biomédica*. 2007;27(2):176.
17. Salazar M, Carvajal A, Cuellar M, Olaya A, Quiñones J, Velásquez O, Viveros A, Ocampo C. Resistencia a insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti* y *Anopheles spp* en los departamentos de Huila, Valle, Cauca y Nariño. *Memorias XIII Congreso colombiano de parasitología y medicina tropical. Biomédica*. 2007;27(2): 177.
18. Santacoloma L, Brochero H, Chávez B. Estado de la susceptibilidad a insecticidas de *Aedes aegypti* en cinco departamentos de Colombia. *Memorias XIII Congreso colombiano de parasitología y medicina tropical. Biomédica*. 2007;27(2): 175.

19. Maestre R, Rey G, De Las Salas J, Vergara C, Santacoloma L, Goenaga S, Carrasquilla MC. Evaluación de la susceptibilidad de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) a temefós en Atlántico - Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*. 2009;35(2): 202-5
20. Ocampo CB, Salazar-Terreros MJ, Mina NJ, McAllister J, Brogdon W. Estado de resistencia a insecticidas de *Aedes aegypti* en 10 localidades de Colombia. *Acta Trópica*. 2011;118(1):37–44. doi:10.1016/j.actatropica.2011.01.007
21. Maestre-Serrano R, Gomez-Camargo D, Ponce-Garcia G, Flores AE. Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from the Colombian Caribbean Region. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2014;116, 63–73. doi:10.1016/j.pestbp.2014.09.014
22. Instituto Nacional de Salud. Red de vigilancia de la resistencia a insecticidas de uso en salud pública en Colombia. 2018. <http://www.ins.gov.co/buscadoreventos/Informacindelaboratorio/Informe-VRI-2018.pdf>
23. Fonseca-González I, Quiñones ML, Lenhart A, Brogdon WG. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. *Pest Manag Sci*. 2011;67(4):430–7. PMID:21394876.
24. Santacoloma L, Chaves B, Brochero H. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a DDT, deltametrina y lambdacialotrina en Colombia. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal*. 2010;27(1):66–73. DOI: 10.1590/S1020-49892010000100010
25. Rojas-Álvarez D. Contribución de la vacuna al programa de prevención y control de dengue. *Biomédica*. 2011;31(sup.3),3-315.

26. González Duque J. Vigilancia de susceptibilidad a insecticidas de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi*, *An. (N.) nuneztovari* y *An. (N.) albimanus* en localidades centinelas de los departamentos de Antioquia, Cauca, Choco, Córdoba y Valle del Cuaca. Año 2009 - 2014. 2015. <https://studylib.es/doc/8461416/10.resistenciaa-insecticidas>
27. Marquetti MC. Aspectos bioecológicos de importancia para el control de *Aedes aegypti* y otros culicidos en el ecosistema urbano [Doctorado]. Instituto de medicina tropical “PEDRO KOURÍ”, departamento control de vectores. 2006.
28. Maestre-Serrano R, Pareja-Loaiza P, Gómez Camargo D, Ponce-García G, Flores AE. Co-occurrence of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodium channel and resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* (L.) from the Colombian Caribbean region. *Pest Manag Sci.* 2019;75(6):1681–8. PMID:30520256
29. Leiva N, Cáceres O. Variabilidad genética de *Aedes aegypti* en algunas áreas del Perú usando Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP). *Rev. perú. med. exp. salud pública.* 2004;21(3): 157-166.
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342004000300007&lng=es.](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342004000300007&lng=es)
30. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA). 2024.
<https://www.ins.gov.co/Direcciones/Vigilancia/Paginas/SIVIGILA.aspx>
31. Ardila S, Santacoloma L, Brochero L. Estado de la susceptibilidad a insecticidas de uso en salud pública en poblaciones naturales de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del departamento de Casanare, Colombia. *Biomédica.* 2013;33(3):446-58.
DOI:10.7705/biomedica.v33i3.1534.

32. McGregor BL, Connelly CR. A Review of the Control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Continental United States, *Journal of Medical Entomology*. 2021;58(1):10–25. DOI:10.1093/jme/tjaa157
33. Suleman M, Arshad M, Khan K. Yellowfever Mosquito (Diptera: Culicidae) Introduced into Landi Kotal, Pakistan, by Tire Importation, *Journal of Medical Entomology*. 1996;33(4,1):689–693. DOI:10.1093/jmedent/33.4.689
34. Bisset J, Rodríguez M, Fernández D. Resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de dos provincias del Perú. *Rev Cub Med Trop*. 2007;58:210–216. ISSN 1561-3054.
35. Powell JR, Tabachnick WJ. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013;108:11-17. DOI:10.1590/0074-0276130395
36. Nelson MJ. *Aedes aegypti*: biology and ecology. 1986. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/28514>
37. Rodríguez M, Bisset J, Fernández D, Pérez O. Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de esterasa A4 asociada con la resistencia a temefos. *Rev Cubana Med Trop*. 2004;56(1):54-60. ISSN 1561-3054.
38. Aparecida-Braga I, Pereira-Lima J, Da Silvasoares S, Valle D. *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*. 2004;99(2):199-203. DOI:10.1590/S0074-02762004000200015

39. Chávez J, Vargas J, Vargas F. Resistencia a deltametrina en dos poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del Perú. *Rev. peru. biol.* 2005;12(1):161-4. ISSN 1727-9933.
40. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Evaluación de las estrategias innovadoras para el control de *Aedes aegypti*: desafíos para su introducción y evaluación del impacto. Washington, D.C. 2019. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51376>
41. Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO). International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. Roma: FAO. 1986:28.
42. World Health Organization (WHO). Vector resistance to pesticides. Fifteenth report of the expert committee on vector biology and control. In WHO Tech. Rep. Ser. 1992;818:155. <https://iris.who.int/handle/10665/37432>
43. Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO). Pest resistance to pesticides in agriculture. Importance, recognition and counter measures. Roma: FAO. 1970:32.
44. Miller TA. Mechanisms of resistance to pyrethroid insecticides. *Parasitol Today.* 1988;4:8-12. DOI:10.1016/0169-4758(88)90080-4
45. Hemingway J, Ranson H, Jensen B, Vulule, J, Wang X, Collins F. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol. Biol.* 2000;9:491-497. DOI:10.1046/j.1365-2583.2000.00209.x
46. Fonseca I, Quiñones M. Resistencia a insecticidas en mosquitos (Díptera: Culicidae): mecanismos, detección y vigilancia en salud pública. *Rev Colomb Entomol.* 2005;31(2):107-115. ISSN 2665-4385.

47. González G. Resistencia a insecticidas en el mosquito vector del dengue *Aedes aegypti* (l) en dos épocas De transmisión de la enfermedad en Mérida, Yucatán. [Doctorado]. Universidad Autónoma de Nuevo León. Mérida, Yucatán. México. 2013:132. <http://eprints.uanl.mx/3488/>
48. Saume F. Introducción a la química y toxicología de insecticidas. Industria Gráfica Integral C.A., Maracay, Venezuela. 1992:212.
49. Hemingway J, Ranson H. “Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease.” *Annu Rev Entomol.* 2000;45(1):371–91. DOI:10.1146/annurev.ento.45.1.371
50. Scott JA. The molecular Genetics of Resistance: Resistance as a Response to Stress. *Florida Entomologist.* 1995;78(3):399-414. <https://journals.flvc.org/flaent/article/view/59144/56823>
51. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase, *Methods in Enzymology.* Academic Press, 1985;113:484-490. DOI:10.1016/S0076-6879(85)13062-4.
52. Hemingway J, Miyamoto J, Herath P.R.J. A possible novel link between organophosphorus and DDT insecticide resistance genes in *Anopheles*: Supporting evidence from fenitrothion metabolism studies. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 1991;39(1):49-56. DOI:10.1016/0048-3575(91)90213-6.
53. Polson KA, Brogdon WG, Rawlins SC, Chadee DD. Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta Trop.* 2011;117(1):31-8. PMID:20858454.
54. Brogdon WG, McAllister JC, Corwin AM, Cordon-Rosales C. Oxidase-Based DDT Pyrethroid Cross-Resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 1999;64:101-111. DOI:10.1006/pest.1999.2415

55. Kasai S, Weerasinghe IS, Shono T, Yamakawa M. Molecular cloning, nucleotide sequence and gene expression of a cytochrome P450 (CYP6F1) from the pyrethroid-resistant mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2000;30(2):163-171. DOI:10.1016/S0965-1748(99)00114-9.
56. Soderlund DM. Molecular Mechanisms, of Insecticide Resistance. *Chemistry of Plant Protection*. 1997:13.
57. Li X, Schuler MA, Berenbaum MR. Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. *Annual Review of Entomology*. 2007;52:231–253. DOI:10.1146/annurev.ento.51.110104.151104
58. Giglioli AAS, Lucena ALM, Lapenta AS. Identificação e Caracterização das Esterases em *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Saúde e Biologia*. 2011;6(1):25-35. <http://68.183.29.147/revista/index.php/sabios/article/view/769>
59. Mori A, Lobo NF, deBruyn B, Severson DW. Molecular cloning and characterization of the complete acetylcholinesterase gene (*Ace1*) from the mosquito *Aedes aegypti* with implications for comparative genome analysis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2007;37(7):667-674. DOI:10.1016/j.ibmb.2007.03.014.
60. Hall LM, Spierer P. The *Ace* locus of *Drosophila melanogaster*: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader. *EMBO J*. 1986;5:2949–2954. PubMed:3024971.
61. Mutero A, Pralavorio M, Bride JM, Fournier D. Resistance-associated point mutations in insecticideinsensitive acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;9:5922–5926. PubMed:8016090.

62. Kozaki T, Shono T, Tomita T, Kono Y. Fenitroxon insensitive acetylcholinesterases of the housefly, *Musca domestica* associated with point mutations. *Insect Biochem Mol Biol.* 2001;31:991–997. PubMed:11483435.
63. Walsh SB, Dolden TA, Moores GD, Kristensen M, Lewis T, Devonshire AL, Williamson MS. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochem J.* 2001;359:175–181. PubMed:11563981.
64. Chen Z, Newcomb R, Forbes E, McKenzie J, Batterham P. The acetylcholinesterase gene and organophosphorus resistance in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2001;31:805–816. PubMed:11378416.
65. Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, Raymond M. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol.* 2004;13:1–7. PubMed:14728661.
66. Alout H, Berthomieu A, Hadjivassilis A, Weill M. A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus. *Insect Biochem Mol Biol.* 2007;37:41–47. PubMed:17175445.
67. Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, Berticat C, Pasteur N, Philips A, Fort P, Raymond M. Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature.* 2003;423:136–137. PubMed:12736674.
68. Muthusamy R, Shivakumar MS. Susceptibility status of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to temephos from three districts of Tamil Nadu, India. *J Vector Borne Dis.* 2015;52(2):159-65. PMID: 26119549.

69. Nabeshima T, Mori A, Kozaki T, Iwata Y, Hidoh O, Harada S, Kasai S, Severson DW, Kono Y, Tomita T. An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. *Biochem Biophysical Res Comm.* 2004;313:794–801. DOI:10.1016/j.bbrc.2003.11.141.
70. Weill, M., Fort, P., Berthomieu, A., Dubois, M.P., Pasteur, N., Raymond, M. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non homologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. London B.* 2002;269:2007–2016. DOI:10.1098/rspb.2002.2122.
71. Bisset J, Rodríguez MM, Fernandez, D. Selection of insensitive acetylcholinesterase as a resistance mechanism in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Santiago de Cuba. *J. Med. Entomol.* 2006;43:1185–1189. DOI:10.1093/jmedent/43.6.1185.
72. Weill M, Berthomieu A, Berticat C, Lutfalla G, Negre V, Pasteur N, Philips A, Leonetti JP, Fort P, Raymond M. Insecticide resistance: a silent base prediction. *Curr Biol* 2004;14:R552–R553. PubMed:15268871.
73. Organización Mundial de la Salud (OMS). Procedimientos de las pruebas para la vigilancia de la resistencia a los insecticidas en los mosquitos vectores del paludismo. Segunda Edición. Ginebra. 2017:1–50.
<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258960/9789243511573-spa.pdf?sequence=5>.
74. Brogdon WG, Mcallister JC. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *Journal of the American Mosquito Control Association.* 1998;14(2):159-164. PMID:9673916.

75. Brogdon WG, Barber AM. Microplate assay of acetylcholinesterase inhibition kinetics in single-mosquito homogenates. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 1987;29(3):252-259. DOI:10.1016/0048-3575(87)90155-6.
76. Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Braga IA, Valle D. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77(3):467-77. PMID:17827362.
77. Hall, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*. 1999;41:95-98. <https://sid.ir/paper/613985/en>
78. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and CLUSTALX version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23:2947-2948. DOI:10.1093/bioinformatics/btm404.
79. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013;30:2725-2729. DOI:10.1093/molbev/mst197.
80. Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980;16:111-120. DOI:10.1007/BF01731581.
81. Cam, L. Maximum Likelihood: An Introduction. *International Statistical Review / Revue Internationale de Statistique*, 1990;58(2):153-171. DOI:10.2307/1403464.
82. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985;39:783-791. DOI:10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x.

83. Hoyos-Lopez R, Roman Pardo S, Castaño JC, Gallego-Gómez JC. DNA barcode for typing of immature mosquitoes from Armenia and Circasia (Quindío, Colombia). *Revista Colombiana de Entomología*. 2015;41(2):218-227. ISSN 0120-0488.
84. Rey Vega G. DETERMINACIÓN DE LOS GRADOS DE RESISTENCIA AL INSECTICIDA TEMEFOS EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* LINNAEUS 1762, (DIPTERA: CULICIDAE) Y SU IMPLICACIÓN EN LA EFICACIA DEL INSECTICIDA EN LOS DEPARTAMENTOS DE CAUCA, LA GUAJIRA, CUNDINAMARCA Y ATLÁNTICO. [Tesis de Maestría]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. 2011. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/8674>
85. Melo-Santos M, Varjal-Melo J, Araújo A, Gomes T, Paiva M, Regis L, Furtado AF, Magalhaes T, Macoris M, Andrighetti M, Ayres C. Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta tropica*. 2009;113:180-9. 10.1016/j.actatropica.2009.10.015.
86. Bisset J, Rodríguez MM, Piedra LA, Cruz M, Gutiérrez G, Ruiz A. Reversal of Resistance to the Larvicide Temephos in an *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Laboratory Strain From Cuba, *Journal of Medical Entomology*. 2020;57(3):801–806, <https://doi.org/10.1093/jme/tjz206>
87. Lima E, Santos M, De Araujo M, Gomes E, Da Silva U, De Oliveira L, Santana A, Nogueira S, De Paiva C, Goulart M, Wilding C, Junqueira C, De Melo M. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites & Vector*. 2011;4(5):4-12.

88. Prieto A, Suárez M, González R. Susceptibilidad de dos poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Cali (Valle, Colombia) a temefos (Abate) y triflumuron (Starycide). *Revista Colombiana de Entomología*. 2002;28(2): 175 – 178.
89. Maestre-Serrano R, Flórez-Rivadeneira Z, Castro-Camacho JM, Ochoa-Bohórquez L, Gómez-Camargo D, Pareja-Loaiza P, et al. Evaluación de la sensibilidad a organofosforados en poblaciones de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) del departamento de La Guajira, Colombia. *Biomédica*. 2023;43:296-304. DOI:10.7705/biomedica.6677.
90. Rojas W, González J, Amud M, Quiñones M, Vélez I. Evaluación de la susceptibilidad de *Aedes aegypti* del municipio de Barrancabermeja, Santander a los insecticidas malatión, fenitrotión, temefos, lambdacialotrina, deltametrina, permetrina, propoxur y DDT. 2003. *Biomédica*. 2003;23(Supl.1):35-6.
91. Mazzarri MB, Georghiou GP. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc*. 1995;11:315-22.
92. Motta Sánchez A, Tonn R, Uribe LJ, Calheiros LB. Comparación de la eficacia de varios métodos de aplicación de insecticidas para el control o la erradicación del *Aedes aegypti* en Colombia. *Bol Of Sanit Panam*. 1978;84(1).
93. Ministerio de la Protección Social de Colombia. 2010. Gestión para la vigilancia Entomológica y control de la Transmisión de malaria. 1-131 p. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/gestion-vigilancia-entomologica-malaria.pdf>

94. Flores A, Albeldaño-Vásquez W, Fernández-Salas I, Badii M, Loaiza-Becerra H, Ponce Garcia G et al. Elevated á-esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, México. *Pestic Biochem Physiol.* 2005;82:66-78. DOI:10.1016/j.pestbp.2004.12.007
95. Flores AE, Grajales JS, Salas IF, Garcia GP, Becerra HL, Lozano S, et al. Mechanisms of Insecticide Resistance in Field Populations of *Aedes aegypti* (L.) From Mechanisms of Insecticide Resistance in Field Populations. *J Am Mosq Control Assoc.* 2006;22(4):672–7. PMID:17304936.
96. Harris AF, Rajatileka S, Ranson H. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83(2):277–84. PMID:20682868.
97. Rodriguez M, Bisset J, Fernandez D, Perez O. Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de esterasa A4 asociada con la resistencia a temefos, *Rev. Cub. Med. Trop.* 2004;56:54–60. ISSN 1561-3054.
98. Rodriguez M, Bisset J, Ricardo Y, Perez O, Montada D, Figueredo D, et al. Resistencia a insecticidas organofosforados en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Santiago de Cuba, 1997–2009, *Rev. Cub. Med. Trop.* 2010;62:217–223. ISSN 1561-3054.
99. Álvarez L. Caracterización bioquímica y molecular de subpoblaciones silvestres de *Aedes aegypti* (l) de Venezuela sometidas a presión con insecticidas de uso común. [Tesis de doctorado]. México: Universidad Autónoma de Nuevo León. 2012. <https://cd.dgb.uanl.mx/bitstream/handle/201504211/16373/20226.pdf?sequence=1>
100. Álvarez LC, Ponce G, Oviedo M, López B, Flores AE. Resistance to malathion and deltamethrin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Western Venezuela, *J. Med. Entomol.* 2013;50:1031–1039. DOI:10.1603/ME12254.

101. Grisales N, Poupardin R, Gomez S, Fonseca-Gonzalez I, Ranson H, Lenhart A. Temephos resistance in *Aedes aegypti* in Colombia compromises dengue vector control. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Sep 19;7(9):e2438. doi: 10.1371/journal.pntd.0002438. PMID: 24069492; PMCID: PMC3777894.
102. Hasmiwati H, Rusjdi SR, Nofita E. Detection of Ace-1 gene with insecticides resistance in *Aedes aegypti* populations from DHF-endemic areas in Padang, Indonesia. *Biodiversitas*. 2018;19:31-36. DOI:10.13057/biodiv/d190105
103. Zulhasril, Lesmana SD. *Aedes aegypti* larvae resistance to organophosphate insecticide in Tanjung Priok and Mampang Prapatan, Jakarta. *Maj. Ked FK UKI*. 2010;27(3):96-107.
104. Polson KA, Brogdon WG, Rawlins SC, Chadee DD. Impact of environmental temperatures on resistance to organophosphate insecticides in *Aedes aegypti* from Trinidad. *Rev Panam Salud Publica*. 2012;32(1):1-8. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/9300>