

Perfil de susceptibilidad a Temefos en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Ciudad del Este - Alto Paraná, Paraguay

Maria Ferreira Coronel^I, Luciana dos Santos Dias^{II, III}, Cynara de Melo Rodvalho^{II, III}, José Bento Pereira Lima^{II, III}, Nilsa Gonzalez Britez^I

I Departamento de Medicina Tropical, Área Entomología, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción. Paraguay

II Laboratorio de Fisiología y Control de Artrópodos Vectores, Instituto Oswaldo Cruz, Fundación Oswaldo Cruz, Brasil

III Instituto de Biología del Ejército - IBEx- Brasil

**Cómo referenciar este artículo/
How to reference this article:**

Ferreira M^I, Dias L^{II, III}, Rodvalho C^{II, III}, Lima J^{II, III}, Gonzalez N^I. Perfil de susceptibilidad a Temefos en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Ciudad del Este - Alto Paraná, Paraguay *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 2016;14(2): 98-105

RESUMEN

En Paraguay, el control del mosquito *Aedes aegypti* involucrado en la transmisión de varias arbovirosis implica la utilización del Temefos, un organofosforado que ha sido utilizado por los programas nacionales para el control vectorial por más de dos décadas en busca de la reducción de los estadios larvarios. En vista de la necesidad de evaluar periódicamente la actividad larvicida del compuesto químico mencionado, este estudio tuvo como objetivo monitorear el perfil de susceptibilidad de larvas de *Ae. aegypti* al Temefos. Para ello se aplicó un estudio analítico experimental con ensayos biológicos tipo dosis - respuesta, utilizando larvas del tercer estadio de la primera generación procedentes de una colonia de mosquitos colectada en Ciudad del Este. Las larvas fueron expuestas a la acción del Temefos a diferentes concentraciones definidas por un pre- test. Se registraron valores correspondientes al número de larvas expuestas y mortalidad al término de cada ensayo. Los resultados fueron concentración letal CL50 = 0,00966 mg/L y CL90 = 0,03015mg/L, a partir de estos valores se obtuvieron los indicadores cuantitativos de resistencia, Razón de resistencia RR50 = 2,3734 y RR90 = 4,1643 respectivamente. Este último es un indicativo de resistencia baja en las poblaciones de *Ae. aegypti* evaluadas, acorde con rangos estandarizados (RR>3<5). Los resultados observados en las poblaciones silvestres de larvas revelan una situación de alerta, considerando que el presente estudio evidenció un proceso de resistencia incipiente al Temefos. Finalmente, basados en los resultados se recomienda plantear y ejecutar estrategias basadas en acciones que permitan preservar la actividad larvicida de este compuesto, evitando el aumento progresivo de resistencia en las poblaciones silvestres.

Palabras claves: *Aedes aegypti* - Temefos - Control vectorial.

Aedes aegypti (Diptera-Culicidae) Susceptibility to Temephos in Ciudad del Este, Alto Paraná, Paraguay

ABSTRACT

In Paraguay, the control of *Aedes aegypti* mosquitoes, involved in the transmission of several arboviruses, implies the use of temephos, an organophosphate that has been used by national vector control programs for more than two decades in search of reducing larval stages. In view of the need to evaluate periodically the larvicidal activity of this chemical compound, this study aimed to monitor the susceptibility profile to temephos of larval

Fecha de recepción: junio 2016. Fecha de aceptación: agosto 2016

Autor correspondiente: **Nilsa Gonzalez Britez** Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud, UNA, Paraguay
E-mail: gbritez.nilsa@gmail.com

stages of *Ae. aegypti*. For this, an experimental analytical study with bioassays dose rate – response was applied, using third instar larvae of the first generation from a mosquitoes colony collected in Ciudad del Este. The larvae were exposed to different concentrations ranges of temephos that were defined by a pre-test. The number of larvae exposed and mortality at the end of each trial were recorded. The results determined the LC50 = 0.00966 mg/L and LC90 = 0.03015 mg/L, from which quantitative indicators of resistance were obtained, resistance ratio RR = 2.3734 and 4.1643 respectively. The latter value indicates characteristics related to low resistance in populations of *Ae. aegypti* evaluated according to standardized ranges (RR > 3 < 5). The results observed in larval wild populations indicate an alert situation, considering that our study showed an incipient process of resistance to temephos. Finally, based on these results, proposing and implementing strategies based in actions that allow to preserve the larvicidal activity of this compound are recommended to avoiding the progressive increase of resistance in wild populations.

Keywords: *Aedes aegypti*, Temephos, Vector Control

INTRODUCCIÓN

El mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus 1762 es reconocido como el artrópodo más importante en la transmisión de los virus responsables del dengue y la fiebre amarilla urbana en humanos (1). Este vector presenta fuerte asociación con las viviendas humanas, así como un alto grado de susceptibilidad para infectarse con diversos virus. Su característica antropofílica y su capacidad de tomar más de una alimentación sanguínea durante su ciclo gonotrófico incrementan dramáticamente su capacidad vectorial (2).

Diversos países de América siguen reportando infecciones graves por virus del dengue y recientemente se han registrado casos de fiebre Chikungunya (CHIK), una enfermedad emergente causada por un virus ARN, y fiebre por Virus Zika (ZIKV), un arbovirus muy cercano filogenéticamente al virus del dengue. Estas enfermedades representan un grave problema de salud pública y pueden afectar negativamente la economía de los países en la región (1,3). En el 2013, Paraguay registró la peor epidemia de dengue de su historia con 150.000 casos y 252 muertes (4). El Dpto. de Alto Paraná fue uno de los más afectados con 2.877 casos registrados (5).

En enero del 2016, Paraguay declaró alerta epidemiológica por Dengue, fiebre del ZIKV y CHIK viéndose afectados varios Departamentos del interior del país en los cuales se registró circulación simultánea de los serotipos de DEN-1 y DEN-4, como en el Dpto. de Amambay. Además de lo mencionado, se registró también la co-circulación con el ZIKV (6).

Debido a la problemática que suscitan estas enfermedades, la OMS recomendó instaurar un sistema que permita diagnosticar y tratar a los pacientes, y fundamentalmente establecer estrategias efectivas acorde a las necesidades de la población afectada con el objetivo primordial de controlar la población de mosquitos reduciéndola en lo posible.

Con el objeto de combatir a este agente transmisor, los programas de control vectorial han utilizado compuestos químicos larvicidas y adulticidas, cuya utilización prolongada ha conducido indefectiblemente a la selección de individuos resistentes a uno o más compuestos (7,8,9). El vector *Ae. aegypti* ha desarrollado cepas resistentes a través de la sobrevivencia y reproducción, reflejando como consecuencia la presencia de individuos con genes que codifican para mecanismos que confieren resistencia (10).

Durante las últimas décadas, el tratamiento focal utilizado para el control de larvas de *Ae. aegypti* se basó en el control químico. El insecticida más utilizado es el Temefos (O,O,O',O' - tetrametil, O'-tiodi - p-fenilen difosforotioato), insecticida organofosforado caracterizado por su actividad larvicida y su baja toxicidad hacia mamíferos, de muy bajo costo y largo efecto residual.

Sin embargo el uso de Temefos en salud pública está siendo restringido hoy en día debido a la aparición de resistencia en distintos países de Latinoamérica (11). Varios países de América Central y del Sur han reportado resistencia al larvicida Temefos, tales como Argentina, Brasil, Bolivia, Cuba, Colombia, El Salvador, Perú y Venezuela (12-19).

Paraguay precisa contar con datos respecto al comportamiento de las poblaciones de campo de *Ae. aegypti* en presencia de adulticidas y larvicidas utilizados para el control vectorial. Ciudad del Este, (CDE) localizada en la frontera con Brasil y Argentina, constituye una de las áreas urbanas más importantes del país por su desarrollo económico y por el

alto flujo migratorio de carácter comercial y turístico. Esta región a partir del 2013 ha sido afectada frecuentemente por numerosos casos de dengue y por ende, son continuas las intervenciones que implican el control químico con insecticidas. Ciudades fronterizas de esta región, tales como Foz de Iguazú (Brasil) y Puerto Iguazú (Argentina) han reportado estudios de evaluación de resistencia de *Ae. aegypti* en los cuales hacen referencia a modificaciones en la susceptibilidad de las poblaciones naturales, identificando niveles bajos de resistencia a Temefos (12,20). Así, la aplicación de estos compuestos constituye una poderosa fuerza evolutiva, al permitir la sobrevivencia de aquellos individuos que poseen características fenotípicas de resistencia y éstos heredan esa capacidad a sus descendientes. Por tal motivo, se ha afirmado que el uso correcto de un plaguicida efectivo sobre una población susceptible produce cambios genéticos y fenotípicos que se traducen tarde o temprano en la falta de control de los insectos (21). De este modo, la detección temprana de resistencia de larvas y adultos de *Ae. aegypti*, frente a los compuestos químicos utilizados para controlarlos se puede lograr mediante un sistema de monitoreo periódico que permita el manejo racional de los insecticidas. Una alternativa a plantear en caso de detectarse resistencia en las poblaciones consistiría en la implementación de un sistema que implique el uso alternado de los insecticidas, con el objetivo de reducir la presión que ejerce un determinado compuesto químico sobre poblaciones de campo susceptibles, que se vuelven resistentes al cabo del proceso de selección por exposición reiterada a estos compuestos.

Considerando que el fenómeno de resistencia constituye un problema que afecta el desempeño de los programas de control vectorial, el presente estudio pretende evaluar el perfil de susceptibilidad a Temefos de poblaciones naturales de *Ae. aegypti* en Ciudad del Este, Alto Paraná, con el fin de proporcionar información relevante respecto al fenómeno de resistencia y contribuir de esta forma con las estrategias de prevención y control de las enfermedades transmitidas por *Ae. aegypti* en esta región.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección del área de estudio y colecta de material biológico: Los puntos para la instalación de ovitrampas fueron seleccionados en forma aleatoria mediante el programa gv-SIG version 1.11.0 (Sistema de Información para análisis y gestión de datos Geográficos). Las trampas de oviposición fueron preparadas acorde a metodología descrita por Fay & Eliason (1966) (22), según las normativas del CDC. Las mismas fueron colocadas en lugares sombreados y próximos a criaderos domésticos potenciales del peridomicilio de viviendas particulares y recintos comerciales del Barrio Ciudad Nueva de CDE. Las paletas fueron retiradas y trasladadas al laboratorio para cuantificar los huevos de *Aedes*.

Establecimiento de colonias y generación de mosquitos Filial 1: Bajo condiciones controladas para la cría de mosquitos (fotoperiodo; horas de luz y oscuridad de 12h; temperatura 26 ± 2 °C y humedad relativa 60 ± 20 %), se establecieron las colonias de la cepa Rockefeller y de la cepa silvestre CDE.

A partir de la colonia parental de mosquitos silvestres, se obtuvieron 6000 huevos, los cuales fueron hidratados y mantenidos hasta obtener larvas del tercer estadio (L3) de la primera generación. Las mismas procedían de CDE, Alto Paraná y se denominaron cepa "CDE". Para la obtención de L3 de la cepa Rockefeller (utilizada como referencia susceptible a insecticidas) se hidrataron 13000 huevos donados por el Laboratorio Laficave del Instituto Osvaldo Cruz, Brasil.

Preparación de las soluciones de Temefos: Se utilizó el larvicida Temefos (*Pestanal*, *Sigma Aldrich*) (O,O,O',O' - tetrametil, O'-tiodi - p-fenilen difosforotioato). A partir de una solución madre, se prepararon soluciones de trabajo de: 3 mg/L, 6 mg/L y 9 mg/L que fueron usadas para los bioensayos acorde a las recomendaciones de la OMS y un protocolo estandarizado por el Laboratorio Laficave (23).

Bioensayos dosis –respuesta a Temefos de larvas de *Aedes aegypti*.

Para el tratamiento se utilizaron 20 larvas del tercer estadio, desarrollando 4 replicas por cada concentración del larvicida con un total de 880 larvas por cada bioensayo. Las larvas de la cepa Rockefeller fueron expuestas al Temefos en forma paralela a cada ensayo con el fin de ser utilizadas como control interno.

Criterios de evaluación y análisis de los datos

Los ensayos dosis respuesta desarrollados fueron evaluados de acuerdo a los criterios definidos por Mazzari *et al.* (1995) y Campos *et al.* (2003) quienes han utilizado los

indicadores cuantitativos de resistencia; *Razón de resistencia* (RR). De esta forma, los rangos para evaluar el nivel de resistencia de una cepa de acuerdo con la Razón de resistencia fueron determinados de la siguiente forma:

RR<3 constituye una población susceptible, RR>3 y <5 constituyen poblaciones que presentan resistencia baja, RR>5 y <10 es indicativo de resistencia moderada, RR>10 y <20 resistencia media y finalmente valores de RR>20 indican poblaciones altamente resistentes (24, 25).

Las concentraciones de Temefos establecidas previamente fueron aplicadas a las poblaciones larvarias y la letalidad de las mismas fue controlada en las 24 horas posteriores al inicio de bioensayo. Las concentraciones letales del 50% y 90 % (CL50 y CL90, respectivamente) fueron determinadas mediante el programa Probit-log (26). Se calcularon los valores RR50 y RR90 de la cepa silvestre y fueron comparados con los obtenidos para la cepa Rockefeller (24,25). La mortalidad de esta última es aceptable basada en rangos tolerables para la cepa control que requieren de correcciones por la fórmula de Abbott, 1925, cuando estos rangos superan el 5% de mortalidad (27). Así, los índices de mortalidad de los controles mayores al 20 % significan no aceptar la prueba y repetirla (28).

RESULTADOS

Determinación de la susceptibilidad al Temefos: Los bioensayos realizados acorde a los protocolos de la OMS permitieron confirmar el perfil de susceptibilidad de las poblaciones naturales de larvas en estadio L3 de *Ae. aegypti* de Ciudad del Este, Alto Paraná. De acuerdo con los criterios establecidos, la población larvaria evaluada mostró alteraciones en la susceptibilidad cuando fue sometida a los bioensayos con Temefos. Los resultados obtenidos sobre las larvas de esta población para las concentraciones letales que eliminan el 50 y 90 % de los individuos (CL50 y CL90) fueron comparados con valores encontrados en la cepa Rockefeller para estimar los valores de razón de resistencia RR 50 y RR 90. El valor obtenido para la concentración CL50 de la cepa silvestre fue de 0,00966 mg/L, mientras que para la cepa de referencia fue 0,00407 mg/L. El valor RR50 correspondiente fue de 2,37 que, según los criterios mencionados previamente, es indicativo de una población que permanece susceptible al insecticida. Sin embargo, con la CL90 el valor obtenido fue 0,03015 mg/L para la cepa silvestre y 0,00724 mg/L para la cepa Rockefeller, y el valor que define la razón de resistencia corresponde a RR90 = 4,1643 que, según criterios pre establecidos, demuestra un estado de resistencia incipiente en la población de *Ae. aegypti* de CDE. Estos valores se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones letales y razón de resistencia a Temefos observadas en larvas de *Ae. aegypti* del municipio de Ciudad del Este, Dpto. Alto Paraná, Paraguay.

| Insecticida | Cepa Rockefeller | | Cepa Ciudad del Este | | RR |
|-------------|------------------|----------------------------------|----------------------|------------------------------|-------|
| Temefos | CL50 | Rango | CL50 | Rango | RR 50 |
| | 0,0041 | 0,00401 - 0,00413 | 0,0097 | 0,00912-0.01023 | 2,373 |
| | CL90 | Rango | CL90 | Rango | RR90 |
| | 0,0072 | 0,00709 - 0,00740 b: 5,117311 | 0,0302 | 0,02823-0,03221 b: 2,5918 | 4,164 |

CL50: concentración letal en la que muere 50% de las larvas, en mg/L; **CL90:** concentración letal en la que muere 90% de las larvas, en mg/L. **RR50:** Razón de resistencia, razón entre la CL50 de la cepa a evaluar y la cepa Rockefeller. **RR90:** Razón de resistencia, razón entre la CL90 de la cepa a evaluar y la cepa Rockefeller. b: pendiente de la recta probit-log que relaciona la letalidad con el logaritmo de la concentración de insecticida.

En la Figura 1 se muestra la pendiente de la recta Probit - log que relaciona la letalidad en larvas de la cepa Ciudad del Este con el logaritmo de la concentración del larvicida Temefos. La cepa Rockefeller fue incluida como control de susceptibilidad. La línea de regresión referida a la población silvestre evaluada se encuentra desplazada hacia la derecha respecto a la línea correspondiente a la cepa Rockefeller.

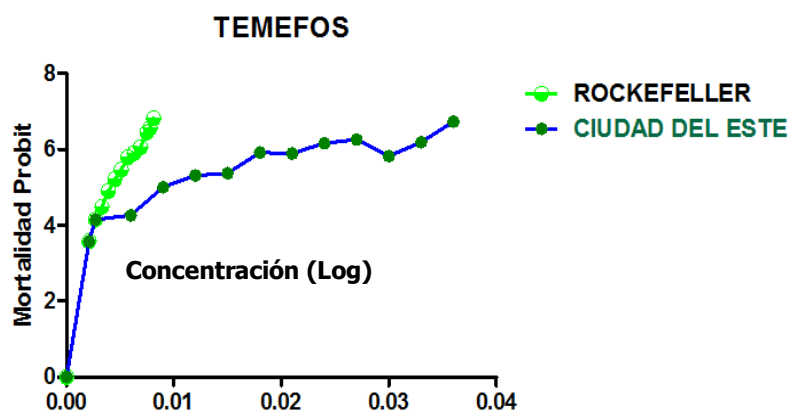


Figura 1. Mortalidad Probit de larvas de la F1 de *Aedes aegypti*, procedentes del municipio de Ciudad del Este, demostrada por el logaritmo de las concentraciones del larvicida Temefos.

DISCUSIÓN

En Paraguay, el larvicida Temefos es utilizado por el SENEPA, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, para el control de *Ae. aegypti* en las campañas contra el dengue y otras enfermedades transmitidas por este vector. El uso de Temefos se inició en 1991 (datos brindados por SENEPA), y desde entonces es aplicado ininterrumpidamente en el control de larvas de mosquitos.

Así, las áreas con altos índices de infestación larvaria que constituyen zonas mayormente afectadas por las últimas epidemias de dengue y brotes de fiebre CHIK reciben una intervención mucho mayor y en ese contexto es importante mencionar que el uso constante del mismo larvicida genera presión de selección, favoreciendo la aparición de poblaciones resistentes. De esta manera, el estudio realizado demostró resistencia incipiente al Temefos en una población natural de *Ae. aegypti* de CDE, que se evidenció con los valores obtenidos de (CL90) y la RR superior a 3, mostrando así un nivel bajo de resistencia al larvicida testado. Este comportamiento poblacional debe ser considerado como un parámetro de alerta, ya que en la región de Alto Paraná no existen estudios previos que permitan comparar estos índices. No obstante, un estudio previo en la ciudad de Puerto Iguazú, Argentina (frontera con el departamento de Alto Paraná) demostró que entre los años 2006/2007 ya se habían detectado valores de resistencia incipiente (RR= 3,057) a Temefos en larvas de *Ae. aegypti* colectadas en dicha ciudad. Los autores han concluido además que no hubo fallas en el control durante el experimento y esto permitió validar el resultado obtenido (29,12). En ese sentido, este estudio llevado a cabo en Alto Paraná, está acorde con los resultados de Argentina, teniendo en cuenta que los valores de razón resistencia de las larvas fueron bajas, sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de una introducción pasiva de haplotipos resistentes hacia nuestro país, mas aun considerando que la región del Alto Paraná es una zona fronteriza con intenso tráfico comercial y migración de personas que pueden contribuir a la expansión de genes involucrados con la resistencia a los organofosforados de uso frecuente.

Por otra parte, el uso del Temefos para el control químico de larvas de mosquitos por largos periodos de tiempo constituye un proceso de selección de individuos resistentes, por lo cual es inminente el aumento de niveles de resistencia a este larvicida, como ya fue demostrado en otro estudio reciente realizado con cepas de *Ae. aegypti* de Asunción, en el cual las poblaciones presentaron valores de resistencia similares a los resultados obtenidos en este trabajo (30). De la misma manera, otros autores reportaron diversos índices de resistencia desarrollados por la exposición continua de larvas al Temefos (7,13,31). Dicha resistencia es una característica heredable, que se establece entre otros factores como respuesta a la aplicación continua del compuesto en un mismo ambiente.

Como alternativa para el control larvario, SENEPA realizó pruebas de eficacia con otros larvicidas, tal como el BTI (*Bacillus thuringiensis israelensis*), que en el 2013 fue sometido a

bioensayos en campo y laboratorio y los resultados no fueron satisfactorios ya que no presentó efectos de mortalidad sobre larvas (32).

Con respecto al logaritmo de la concentración del larvicida, se puede deducir que son necesarias concentraciones mayores del insecticida para matar al 100% de la población silvestre en comparación a la cepa susceptible (Rockefeller).

En la Tabla 1 se muestran los valores de la pendiente de la recta de regresión obtenidos a partir del análisis con el Programa Probit (26,33) que denotan valores de 5,117311 y 2,5918 para la cepa Rockefeller y silvestre respectivamente. Hay estudios que consideran que cuanto más bajo es el valor de la pendiente de la recta, más heterogénea es la población (34). A partir de esta afirmación, se infiere que la cepa silvestre CDE es una población heterogénea respecto a la cepa susceptible Rockefeller, por lo tanto existe una tendencia hacia la resistencia de la población silvestre. En vista de estos resultados, se puede pensar que en el Dpto. de Alto Paraná están dadas las condiciones para un aumento de los niveles de resistencia en la población silvestre CDE, principalmente debido a las epidemias continuas de dengue y la circulación del virus CHIK y ZIK que afectan a la región. Esto demanda un aumento significativo de las intervenciones que implican el tratamiento focal de criaderos con larvicida y consecuentemente mayor exposición de los insectos al producto. En este sentido y basados en los resultados obtenidos, se concluye que la vigilancia del perfil de susceptibilidad a insecticidas en vectores de importancia médica debe ser un proceso sistemático y sostenible a través del tiempo; de tal forma a brindar información que permita caracterizar las poblaciones silvestres y determinar aquellas localidades que están en riesgo de resistencia incipiente, moderada o alta, mediante pruebas de laboratorio y de campo. Esto permitirá definir la eficacia de los insecticidas utilizados en programas de control vectorial, con el fin de tomar mejores decisiones en cuanto al uso adecuado de los insecticidas y eventualmente si se detecta resistencia, aplicar medidas correctivas inmediatas al respecto.

Los resultados de este estudio definen a la cepa silvestre CDE como una cepa que manifiesta resistencia incipiente o baja, lo que brinda la posibilidad de tomar medidas previas al aumento de resistencia a niveles aún más elevados que los registrados actualmente. Por tanto, es necesario monitorear continuamente las poblaciones de *Ae. aegypti* de diferentes municipios del Dpto. de Alto Paraná, teniendo en cuenta que no existen estudios publicados acerca de este fenómeno. La vigilancia epidemiológica, entomológica y las evaluaciones frecuentes de la actividad larvicida y adulticida de los compuestos químicos utilizados ayudarían a implementar estrategias de control pertinentes para cada municipio. De esta forma, se puede lograr disminuir la presión de selección a la que pudieran estar sometidas las larvas por la aplicación del Temefos, acorde a trabajos ya descritos para otros larvicidas (35,36), además de validar nuevas estrategias que permitan revertir el fenómeno de resistencia, basados en modelos previamente aplicados en otros países que han demostrado aumento gradual de la población de individuos susceptibles y reducción de aquellos resistentes, dado por la suspensión de la aplicación de un determinado larvicida por un periodo aproximado de tres años (37). Finalmente, se puede inferir que la resistencia de poblaciones naturales de *Ae. aegypti* reduce la eficacia del control químico y genera condiciones propicias para el desarrollo de las enfermedades causadas por este vector, por lo cual nuestro estudio aporta datos importantes que deben ser considerados, con el fin de evitar la evolución de la resistencia del mosquito *Ae. aegypti* frente a los insecticidas utilizados de forma frecuente en nuestro país.

Agradecimiento

Este trabajo fue financiado por el programa de becas de Apoyo a la Producción Científica y Tecnológica de la Fundación Parque Tecnológico de Itaipú (FPTI - PY). Los autores agradecen la valiosa colaboración de la Lic. Nidia Martínez y el Lic. Edgar Sanabria del Dpto. de Entomología del Programa de Control Vectorial del SENEPA, quienes apoyaron las colectas en campo. En forma especial se agradece a los técnicos y colaboradores de LAFICAVE y el IBEx de Rio de Janeiro - Brasil, por el asesoramiento proporcionado para el desarrollo de la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Gubler DJ. Dengue and Dengue hemorrhagic fever: its history and surge as a global public health problem. En: Gubler DJ, Kuno G, eds, Dengue and dengue hemorrhagic fever. London: CAB International. 1997:1-22.
2. Platt KB, Linthicum KJ, Myint KS, Innis BL, Lerdthusnee K, Vaughn, DW. Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. Am J Trop Med Hyg. 1997; 57(2):119-25.
3. Palacios Martínez D, Díaz Alonso R, Arce Segura L, Díaz Verad E. Propuesta de un algoritmo de manejo clínico del Centro de Salud San Blas 2014; Servicio Madrileño de Salud –SERMAS, Atención Primaria, Madrid, España.
4. ABC digital. "Paraguay registra 243 casos de Dengue en el mes de Enero y 14.082 casos sospechosos" (acceso 18 de febrero, 2016). Disponible en: <http://www.abc.com.py/nacionales/paraguay-1447941.html>
5. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Base de febriles 2013/2014 Dirección Nacional de Vigilancia Sanitaria. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, 2014.
6. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Noticias importantes "Declaran alerta epidemiológica por Dengue, Zika y Chikungunya en todo el país". Resolución S.G. Nº 001, del 11 de enero del 2016. (acceso 15 de marzo 2016) Disponible en: <http://www.mspbs.gov.py/v3/declaracion-alerta-epidemiologica-por-dengue-zika-y-chikungunya-en-todo-el-pais>.
7. Rodríguez M, Bisset J.A, Ruiz M, SOCA A. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. J Med Entomol. 2002;39(6):882-8.
8. Braga IA, Mello CB, Montella IR, Lima JB, Junior AJ, Medeiros PF et al. Effectiveness of methoprene, an insect growth regulator, against temephos - resistant *Aedes aegypti* populations from different Brazilian localities, under laboratory conditions J Med Entomol. 2005;42:830-7.
9. Andrighetti MTM, Cerone F, Riguetti M, Galvani KC, Macoris MLG. Effect of pyriproxyfen in *Aedes aegypti* populations with different levels of susceptibility to the organophosphate temephos. Dengue Bulletin. 2008;32:186-98.
10. WHO. Expert Committee on Vector Biology and Control Vector Resistance to Pesticides: Fifteenth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology & Control (WHO technical report series; 818). Geneva: World Health Organization. 1992. p.62.
11. Macoris MLG, Camargo MF, Silva IG, Takaku L, Andrighetti MT. Modificacao a susceptibilidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* ao Temephos. Rev Patol Trop. 1995;19:31-40.
12. Albrieu-Llinás GA, Seccacini E, Gardenal CN, Licastro S. Current resistance status to temephos in *Aedes aegypti* from different regions of Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105:113-6.
13. Lima JB, Da-Cunha MP, Da Silva RC, Galardo AK, Soares-Sda S, Braga IA et al. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espirito Santo, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2003;68:329-33
14. Biber PA, Dueñas JR, Ludueña-Almeida FL, Gardenal CN, Almirón WR. Laboratory evaluation of susceptibility of natural subpopulations of *Aedes aegypti* larvae to temephos. J Am Mosq Control Assoc. 2006;22:408-11.
15. Bisset JA, Rodríguez MM, Fernández D, Pérez O. Status of resistance to insecticides and resistance mechanisms in larvae from Playa municipality collected during the intensive campaign against *Aedes aegypti* in Havana City, 2001–2002. Rev Cubana Med Trop. 2004;56:61-6.
16. Grisales N, Poupardin R, Gomez S, Fonseca-Gonzales I, Ranson H, Lenhart A. Temephos Resistance in *Aedes aegypti* in Colombia Compromises Dengue Vector Control. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7:e2438 doi:10.1371/journal.pntd.0002438.
17. Bisset-Lazcano JA, Rodríguez MM, San Martín JL, Romero JE, Montoya R. Assessing the insecticide resistance of an *Aedes aegypti* strain in El Salvador. Rev Panam Salud Pública. 2009;26:229-34.
18. Rodríguez MM, Bisset JA, Fernández D. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American

- countries. J Am Mosq Control Assoc. 2007;23:420-9.
19. Rodríguez MM, Bisset J, de Fernández DM, Lauzán L, Soca A. Detection of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba and Venezuela. J Med Entomol. 2001;38:623-8.
 20. Gambarra WP, Martins WF, Lucena Filho ML, Albuquerque IM, Apolinário OK, Beserra EB. Spatial distribution and sterase activity in populations of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) resistant to temephos. Rev Soc Bra Med Trop. 2013;46(2):178-84.
 21. Rodriguez MM, Bisset, JA, De Armas Y, Ramos F. Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. J Amer Mosquito Control Assoc, 2005; 21, 437-45
 22. Fay RW, Eliason DA. A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. Mosq News. 1966;26:531-34.
 23. WHO. Instruction for Determining the Susceptibility or Resistance of Adult Mosquitoes to Organochlorine, Organophosphate and Carbamate Insecticide- Diagnostic Test. WHO/VBA/1981; 806, Geneva, Switzerland.
 24. Mazzari 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(3):315-22
 25. Campos J, Andrade CF. Larval susceptibility of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* populations to chemical insecticides. Rev. Saúde Públ. 2003;37:1-7.
 26. Raymond M. Présentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. Cah. O.R.S.T.O.M. Ser Entomol Med Parasitol. 1985; 22: 117-21.
 27. Abbott WS. A method for computing the effectiveness of an insecticide, J Econ. Entomol. 1925; 18, 265-7
 28. Busvine JR. Recommended methods for measurement of pest resistance to pesticides, FAO, 1980; Rome. 132 p.
 29. Seccani E, Lucia A, Zerba E, Licastro S, Masuh H. *Aedes aegypti* Resistance to Temephos in Argentina. J Am Mosquito Control Assoc. 2008; 24(4):608-9.
 30. Ferreira M, Rodovalho C, Dias L, Lima JB, Valle D, Gonzalez-Britez N. Estudio de Susceptibilidad a Temefos en una cepa de *Aedes aegypti* originaria de Asunción, Paraguay. XXIII Congreso Latinoamericano de Parasitología (FLAP), Salvador Bahía, Brasil. 2015
 31. Braga IA, Lima JB, Soares 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.
 32. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Insecticidas utilizados por el Programa de Control Vectorial del Dengue, Datos proporcionados por el SENEP. 2013.
 33. Finney DJ. Probit analysis. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 1971; 333 pp.
 34. Bisset JA, Rodríguez MM, Molina D, Díaz C, Soca LA. Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Aedes aegypti* Rev Cub Med Trop. 2001; 53(1): 37-43
 35. Rawlins S. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. Rev Panam Salud Publica. 1998;4(4):243-51.
 36. Duque-Luna J, Ferrer-Martins M, Feliz-Dos Anjos A, Fumio Kuwabara E, Navarro-Silva A. Susceptibility of *Aedes aegypti* to temephos and cipermetrin insecticides, Brazil. Rev Saude Publica 2004; 38 (6): 842-3.
 37. Prieto A, Suarez M, González R. Susceptibilidad de dos poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera- Culicidae) de Cali (Valle, Colombia) a Temefos (Abate) y Triflumuron (Starycide). Rev Colombiana Entomol. 2002;28(2):175-8.