

RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN INSECTOS VECTORES DE ENFERMEDADES CON ÉNFASIS EN MOSQUITOS

Adriana E. Flores, Mohammad H. Badii y Gustavo Ponce G.
Laboratorio de Entomología Médica, Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad Autónoma de Nuevo León
E-mail: adflores@ccr.dsi.uanl.mx

Introducción

Los insecticidas juegan un papel central en el control de vectores de enfermedades tales como mosquitos, moscas, pulgas, piojos, chinches, etc. En 1955 la OMS propuso la erradicación global de una de las enfermedades más prevalentes transmitidas por vectores, la malaria, con el uso de rociados residuales intradomiciliarios de DDT. Sin embargo la euforia por los insecticidas terminó pronto y en 1976 la OMS revirtió su concepto de erradicación a control de la malaria. Los cambios en la política se debieron a la aparición de la resistencia al DDT en un gran número de mosquitos vectores. En 1975 la OMS reportó que una población de 256 millones de personas vivían en áreas donde la resistencia a DDT y/o los BHC (Bifenil Poli Clorinados) mermaron los esfuerzos para el control de la malaria. (Esto no incluyó a la región de África, en donde ocurren el 90% de los casos de Malaria y donde ya se había registrado resistencia de *Anopheles gambiae* al DDT, el principal vector de malaria.)



Los problemas de resistencia continuaron con la rotación a nuevos insecticidas, tales como los organofosforados, carbamatos y piretroides. Operacionalmente, muchos programas de control han cambiado de rociado residual dentro de las casas al uso focal de pabellones impregnados. Esta medida está limitada para los piretroides debido a su velocidad de matar y seguridad para la gente. En la actualidad la investigación se ha enfatizado en los mecanismos moleculares de la resistencia y su manejo racional, con la visión de controlar el desarrollo y la diseminación de poblaciones de vectores resistentes (1).

La resistencia se ha desarrollado a cada uno de los grupos toxicológicos insecticidas, incluyendo microbiales y reguladores del desarrollo de los insectos. Una detallada descripción práctica de resistencia a insecticidas podría permitir que las estrategias de control sean ajustadas imperando la excepción antes que la regla.

Se espera que la resistencia a insecticidas sea directamente afectada por la reemergencia de enfermedades infecciosas (2), y donde la resistencia no ha contribuido a la emergencia de enfermedades se espera que amenace el control de la enfermedad (3). Sin embargo, un cuidadoso análisis de la información reciente acerca de resistencia de vectores (por ejemplo, la base de datos de la OMS y los registros de los programas de control de enfermedades) muestran que el efecto de la resistencia en los esfuerzos del control son aún desconocidos. Muchos reportes de resistencia de especies vectoras están basados en un simple punto geográfico de un País y además información por años o décadas no actualizada. La investigación en cada problema de resistencia y su aplicación en el control de vectores no es práctica. Las medidas de control han sido seleccionadas para usarse, con frecuencia en momentos de emergencia. Aunque las alternativas para el control de vectores con insecticidas están disponibles, los problemas de resistencia a drogas (por ejemplo, Malaria) o bien la disponibilidad o el costo de una vacuna (por ejemplo, Encefalitis japonesa) hacen del control de vectores una opción importante (4,5). La reducción en la disponibilidad de insecticidas como resultado de resistencia se agrava por la eliminación del mercado de insecticidas no registrados para su uso en salud pública. Especialmente en la época

pasada, el costo de mantener ciertos compuestos en el mercado fue mas alto que el que se recuperaba por su uso. En suma a todo esto, el uso de insecticidas es también monitoreado y restringido por agencias reguladoras.

Escala del problema

El número de poblaciones de insectos vectores resistentes es dependiente del volumen y frecuencia de aplicación de insecticidas utilizados para su control, además de las características inherentes de las especies involucradas. La mosca tse tse por ejemplo, fue controlada de manera exitosa con rociados de DDT por muchos años, más sin embargo, nunca se desarrolló resistencia a este insecticida. Otro ejemplo de un insecto vector exhibiendo poca o nula resistencia a insecticidas es la chinche triatomina. En ambos casos podría explicarse en particular debido al ciclo de vida largo de las chinches y la producción de pocos juveniles de mosca tse tse. En contraste, los mosquitos tienen todas las características requeridas para un rápido desarrollo de resistencia, incluyendo ciclos de vida corto y alta fecundidad (6).

Resistencia en mosquitos

Los principales géneros son *Culex* vector de filariasis y encefalitis Japonesa, *Aedes* de dengue y dengue hemorrágico y *Anopheles* de malaria. El rango de distribución de estos no es estático. Por ejemplo, algunas especies de *Aedes* han extendido su rango en Asia y América Latina, incrementando el riesgo de transmisión de dengue en estas áreas.

El DDT fue introducido para el control de mosquitos en 1946. En 1947 se registró el primer caso de resistencia a DDT en *Aedes taeniorhynchus* y *Ae. sollicitans* (7). Desde entonces, más de 100 especies de mosquitos han sido reportadas como resistentes a uno o más insecticidas, y más del 50% son Anofelinos (8). Los insecticidas utilizados en las campañas anti-malaria han incluido a los -BHC, organofosforados, carbamatos y piretroides. Otros grupos insecticidas tales como las benzifenil-ureas y *Bti* (*Bacillus thuringiensis* var *israelensis*) tienen un uso limitado en mosquitos. La tendencia en el manejo de la resistencia es el cambio en el tipo de insecticida.

Mecanismos de resistencia

Los mecanismos de resistencia a insecticidas tienen una base bioquímica (Figura 1). Las dos principales formas de resistencia bioquímica son: resistencia en el sitio blanco, la cual ocurre cuando el insecticida no se enlaza al sitio de acción y por otro lado las enzimas detoxificativas, las cuales ya sea por sus niveles elevados o modificación (esterasas, oxidasas o glutatión-transferasas (GST)) previenen que el insecticida alcance su sitio de acción. Un mecanismo adicional está basado en la respuesta térmica al estrés (9), pero aún no se ha determinado su importancia.

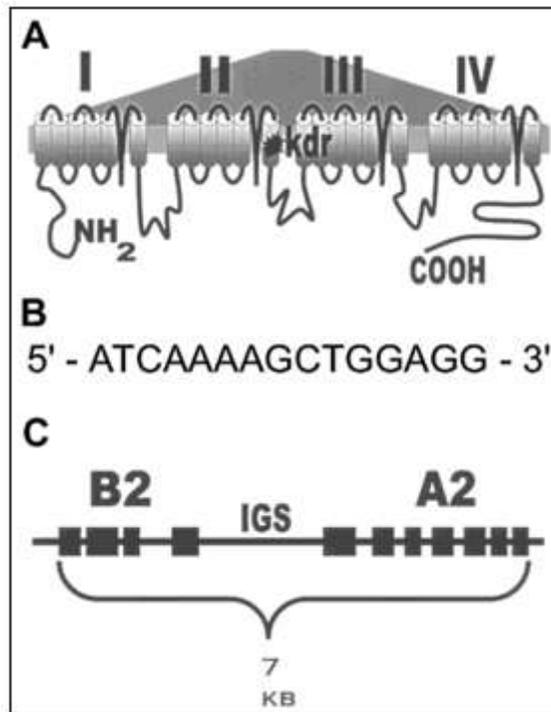


Figura 1. Ejemplos de mecanismos de resistencia a nivel molecular. A. Una simple mutación en la región IIS6 del gene que confiere resistencia en el sitio blanco de acción de piretroides y DDT en *Anopheles gambiae*. El mismo codon mutado produce resistencia en insectos además de mosquitos, tales como cucarachas y moscas. B. Elemento regulatorio conocido como la "Barbie Box" que permite la inducción de genes de resistencia que codifican para oxidasas y esterasas detoxificativas. C. Amplicón para Esterasas A2-B2. Más de 100 copias de este amplicón podrían estar presentes en un simple mosquito. Este es un ejemplo de una familia de genes de esterasas amplificados.

Mecanismos de resistencia en el sitio blanco

La alteración de aminoácidos responsables para el anclaje del insecticida en un sitio específico ocasiona que sea menos efectivo o aún que no funcione. Por ejemplo, el blanco para los organofosforados y carbamatos es en sinapsis nerviosas colinérgicas, y el blanco para el DDT y piretroides sintéticos son los canales de sodio a nivel axónico. La resistencia cruzada entre DDT y piretroides puede producirse por un simple cambio en algún aminoácido (uno o ambos de los dos sitios conocidos) en el sitio de anclaje del insecticida en el canal sodio del axón (10,11). Esta resistencia cruzada parece producir un cambio en la curva de activación del transporte de sodio lo que ocasiona una baja sensibilidad a piretroides (12). De manera similar, la resistencia a ciclodienos (dieldrin) es conferida por cambios en un simple nucleótido en el mismo codon del gen para receptores de ac. Gama-aminobutírico (GABA) (13). Se han identificado al menos cinco sitios mutados en el sitio de acción de la acetil-colinesterasa. Además se sabe que estos ocasionan una gradación en la sensibilidad a organofosforados y carbamatos.

Mecanismos detoxificativos

Las enzimas responsables para la detoxificación de xenobióticos en los organismos son transcritas por miembros de gran número de familias multigene de esterasas, oxidasas y glutatión transferasas (GST). Quizás, el mecanismo de resistencia más común en insectos son diferentes

niveles o actividad de esterasas detoxificativas que metabolizan (hidrolizan enlaces éster) un amplio rango de insecticidas. Estas comprenden seis familias proteicas pertenecientes a la superfamilia de las alfa/beta hidrolasas (14,15).

Las citocromo oxidasas P450 (también denominadas oxigenasas) metabolizan insecticidas a través de O-, S- e hidroxilación N-alquil, hidroxilaciones alifáticas y epoxidaciones, hidroxilaciones aromáticas, oxidación éster y oxidación nitrógeno y tio-éter (16). Las citocromo P450 pertenecen a una vasta superfamilia. De las 62 familias reconocidas de P450 en animales y plantas, al menos cuatro (familias 4,6,9,18) han sido aisladas de insectos. Las insecto-oxidasas P450 responsables de resistencia pertenecen a la familia 6, la cuál, como las esterasas, están presentes en Diptera como un grupo de genes (17). Los miembros del grupo se pueden expresar como alelos múltiples (arriba de 5) (18). Los niveles de oxidasas en insectos resistentes resultan de una sobre-expresión constitutiva más que amplificación (19,20). Los mecanismos de sobreproducción de oxidasas en resistencia están bajo investigación y parecen ser resultado de factores cis- y trans-, asociados al fenómeno de inducción (21, 22).

La mayoría de los organismos poseen múltiples GST de dos o más clases (23). Por ejemplo, las GST implicadas en la resistencia al DDT están presentes como grupos de genes que han sido mezclados a través del genoma por recombinación (24). Se han caracterizado en vectores un número de genes resistentes, incluyendo múltiples formas en el mismo insecto.

Resistencia a reguladores de del desarrollo de insectos (RDI), ivermectinas y otros agentes microbiales.

Los mecanismos iniciales que confirieron resistencia a los RDI estaban basados en oxidasas. La resistencia a las ivermectinas se debe a un sinnúmero de factores, incluyendo la conjugación y alteración en el sitio blanco de acción (25). Aunque los vectores no han demostrado aún resistencia en el campo.

Los agentes microbiales tales como *Bacillus sphaericus* y *B. thuringiensis* se consideran como insecticidas debido a que su agente activo son cristales tóxicos producidos por la bacteria. Los mecanismos de resistencia a *B. sphaericus* aún no están definidos (26, 27), pero parece que están involucrados múltiples mecanismos (28). La resistencia a *B. thuringiensis* es debido al reducido anclaje de la toxina en los peines del lumen del intestino medio de los insectos (29, 30) o bien por la digestión de la toxina por proteasas (31). Las 6 diferentes tipos de toxinas en *B.t.i.* usadas para el control de vectores se esperaba que retardaran o previnieran el desarrollo de mecanismos de resistencia, sin embargo, la resistencia a multitoxinas de *B.t.i.* ya ha aparecido (32, 33).

Resistencia y control de enfermedades

Para comprometer el control de vectores con el uso de insecticidas, el nivel de resistencia debería ser suficientemente alto para afectar adversamente la transmisión de la enfermedad. En muchos casos, el control de vectores podría no ser afectado por el nivel de resistencia. Por ejemplo, cierta actividad podría estar controlando solo el 75 % de la población del vector. Si, por ejemplo, el nivel de resistencia es más bajo del 10%, no afectaría los esfuerzos de control de la enfermedad, ante esta situación, debe incrementarse la vigilancia y el monitoreo de este fenómeno. El oeste de Kenya es un buen ejemplo operacional de coexistencia entre resistencia y control de enfermedades. La resistencia a piretroides apareció rápidamente después de que se introdujeron pabellones impregnados (34). Después de dos años, el nivel de resistencia no había cambiado significativamente, posiblemente debido a la introducción masiva de genes susceptibles (35). Otras razones podrían explicar por que la presencia de genes de resistencia en vectores en una área control no significa que se está logrando un control efectivo. Por ejemplo, los genes de resistencia podrían no expresarse, o podrían expresarse en un estado alternativo de desarrollo del que está

siendo controlado por el insecticida o el gen detectado podría ser miembro de una subfamilia de genes alternativos al que pudiera afectar el compuesto que está siendo usado.

Manejo de poblaciones de vectores resistentes a insecticidas

La práctica de utilizar un solo insecticida hasta la aparición de resistencia se convierte en un factor limitante que reduce rápidamente el número de insecticidas disponibles para el control de vectores. Rotaciones, mosaicos y mezclas de todos ellos han sido propuestas como herramientas para el manejo de la resistencia (36, 37, 38). Se han aplicado numerosos modelos matemáticos para estimar como estas herramientas podrían usarse de manera óptima (39). Sin embargo, estos modelos raramente se han probado bajo condiciones de campo en especial para insectos vectores, debido a las dificultades en estimar cambios en frecuencias de genes de resistencia en grandes muestras de insectos (40). Con la ventaja de diferentes técnicas bioquímicas y moleculares para la estimación de frecuencia de genes de resistencia, las estrategias de manejo de resistencia en campo han llegado a ser más prácticas.

En México se ha hecho un intento a gran escala de usar rotaciones o mosaicos de insecticidas substituyendo el uso simple de DDT o de un piretroide específico (41,42). De esta manera se han monitoreado cambios en la frecuencia de genes de resistencia en *Anopheles albimanus* por cuatro años (43). Estos resultados podrían ayudar a establecer de manera racional estrategias a largo plazo del uso de insecticidas en los programas de control de enfermedades.

Perspectivas para el manejo de la resistencia

La resistencia a los insecticidas en insectos vectores de enfermedades, aún a los piretroides, es generalizada. Con la disponibilidad de técnicas de monitoreo más fáciles y sensibles (44, 45, 46) el manejo de la resistencia estaría al alcance. Uno de los retos en el manejo de la resistencia es que los esfuerzos por controlar las enfermedades transmitidas por vectores están siendo más diversificados. El caso de la malaria es un ejemplo. En los años 50's, la OMS montó un esfuerzo global por erradicar la Malaria. La falla principal de esto fue causada por muchos factores, incluyendo resistencia del vector. Ahora el mejor prospecto de una estrategia global para el control de la malaria parece ser el uso de pabellones impregnados, debido a que son menos costosos que rociar paredes completas con un insecticida residual, son efectivos en reducción de mortalidad infantil y pueden ser manejados a través de un programa comunitario horizontal (47). Este tipo de control significa que el monitoreo de resistencia podría ser manejado e interpretado localmente.

Conclusiones

El incremento en la diversidad de medidas de control de vectores podría requerir de desarrollo de métodos simples y continuos. Ahora bien, las preguntas que surgirían aquí serían: 1) ¿Como podrían los métodos bioquímicos y moleculares equipararse con las simples técnicas de bioensayo?, 2.¿Como podrían simplificarse estos métodos para el personal poco entrenado que intente usarlos?. Inicialmente la detección de la resistencia y el monitoreo en el campo podría continuarse basado en simples bioensayos y posteriormente con pruebas bioquímicas y herramientas moleculares. El entendimiento más profundo de cómo la resistencia se eleva y se mantiene por si misma en poblaciones requiere definitivamente de estudios genético-moleculares.

El conocimiento más completo de los mecanismos de resistencia a insecticidas en vectores de enfermedades procede de estudios con mosquitos. En el caso de otros vectores tales como triatominos, piojos, pulgas, garrapatas, etc., poco ha sido el seguimiento y vigilancia que se les ha dado. Lo más importante es que la detección de resistencia debe ser una parte integral de todos los programas de control. Los recursos para el control de vectores, aún bajo situaciones de

emergencia son muy limitados en muchos Países, por lo que deben ser usados de la manera más efectiva como sea posible.

Referencias

1. Hemingway J. and H. Ranson. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Ann. Rev. Entomol.* 45: 371-391.
2. Brogdon, W. G. and J. C. McAllister. 1998. Insecticide resistance and vector control. CDC, Atlanta, GA, USA. 4(4): 12 pp.
3. Vector resistance to insecticides. 1992. 15th report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. *World Health Organ Tech. Rep. Ser.* 818: 1-62.
4. Krogstad, D.J. 1996. Malaria as a reemerging disease. *Epidemiol. Rev.* 18: 77-89.
5. Rodhain, F. 1996. Données recents sur l'épidémiologie de l'encephalite japonaise. *Bull Acad. Natl. Med.* 180: 1325-1337.
6. Hemingway J. and H. Ranson, *Op.cit.*
7. Brown, A.W.A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2: 123-140.
8. WHO. 1992. Vector resistance to pesticides. Fifteenth report of the expert committee on vector biology and control. In WHO Tech. Rep. Ser. 818: 1-55.
9. Patil, N.S., K.S. Lole and D. N. Deobagkar. 1996. Adaptive larval thermotolerance and induced cross-tolerance to propoxur insecticides in mosquitoes *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *Med. Vet. Entomol.* 10: 277-282.
10. Miyazaki, M., K. Ohyama, D.Y. Dunlap and F. Matsumura. 1996. Cloning and sequencing of the para-types sodium channel gene from susceptible and kdr-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). *Mol. Gen. Genet.* 252: 61-68.
11. Williamson, M.S., D. Martinez-Torres, C.A. Hick and A.L. Devonshire. 1996. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* 252: 51-60.
12. Vais, H., M.S. Williamson, C.A. Hick, N. Eldursi, A.L. Devonshire and P.N. Usherwood. 1997. Functional analysis of a rat sodium channel carrying a mutation for insect knock-down resistance (kdr) to pyrethroids. *FEBS Lett.* 413: 427-332.
13. Ffrench-Constant, R.H., J. Steichen, T.A. Rocheleau, K. Aronstein and R.T. Roush. 1993. A single amino acid substitution in a beta-aminobutyric acid subtype A receptor locus associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 1957-1961.

14. Cygler, M., J.D. Schrag, J.L. Sussman, M. Harel, I. Silman and M.K. Gentry. 1993. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases and related proteins. *Protein Sci.* 2: 366-382.
15. Oakeshott J.G., E.A. van Papenrecht, T.M. Boyce, M.J. Healy and R. J. Russell. 1993. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetica.* 90: 239-268.
16. Wilkinson, C.F. 1976. *Insecticide biochemistry and physiology.* New York: Plenum Press, p. 768.
17. Maitra, S., S.M. Dombroski, L.C. Waters and R. Ganguly. 1996. Three second chromosome-linked clustered Cyp6 genes show differential constitutive and barbital-induced expression in DDT-resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. *Gene.* 180: 165-71.
18. Tomita, T., N.Liu., F.F. Smith, P. Shridhar and J.G. Scott. 1995. Molecular mechanisms involved in increased expression of a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in the housefly, *Musca domestica*. *Insect. Mol. Biol.* 4: 135-140.
19. Tomita, T., J.G. Scott. 1995. cDNA and deduced protein sequence of Cyp6D1: the putative gene for a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in house fly. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 25: 275-283.
20. Carino, F. A., J.F. Koener, F.W. Plapp and R. Feyereisen. 1994. Constitutive overexpression of the cytochrome P450 gene Cyp6A1 in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24: 411-8.
21. Cohen, M.B., J.F. Koener and R. Feyereisen. 1994. Structure and chromosomal localization of Cyp6A1, a cytochrome P450-encoding gene from the house fly. *Gene.* 146: 267-272.
22. Liu, N. and J.G. Scott. 1997. Phenobarbital induction of Cyp6D1 is due to a *trans* acting factor on autosome 2 in house flies, *Musca domestica*. *Insect. Mol. Biol.* 6: 77-81.
23. Hayes, J.D. and D. J. Pulford. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30: 445-600.
24. Zhou, Z-H., and M.A. Syvanen. 1997. A complex glutathione transferase gene family in the housefly *Musca domestica*. *Mol. Gen. Genet.* 256: 187-194.
25. Clark, J.M., J.G. Scott, F. Campos and J.R. Bloomquist JR. 1995. Resistance to ivermectins: extent, mechanisms, and management. *Ann. Rev. Entomol.* 40: 1-30.
26. Rao, D.R., T.R. Mani, R. Rajendran, A.S. Joseph, A. Gajanana and R. Reuben. 1995. Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus*. *J. A. Mosq. Control Assoc.* 12: 247-250.
27. Rodcharoen, J. and M. S. Mulla. 1996. Cross resistance to *Bacillus sphaericus* strains in *Culex quinquefasciatus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 12: 247-250.
28. Nielsen-Leroux, C., F. Pasquier, J.F. Charles, G. Sinigre, B. Gaven and N. Pasteur. 1997. Resistance to *Bacillus sphaericus* involves different mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) larvae. *J. Med. Entomol.* 34: 321-327.

29. Escriche B, B. Tabashnik, N. Finson and J. Ferre. 1995. Immunohistochemical detection of binding of CryIA crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* in highly resistant strains of *Plutella xylostella* (L.) from Hawaii. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212: 388-395.
30. Tabashnik, B.E., T. Malvar, Y.B. Liu, N. Finson, D. Borthakur and B.S. Shin. 1996. Cross resistance of the diamondback moth indicates altered interactions with domain II of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2839-2844.
31. Keller, M., B. Sneh, N. Strizhov, E. Prudovsky, A. Regev and C. Koncz. 1996. Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIc. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 365-373.
32. Tabashnik, B.E., Y.B. Liu, N. Finson, L. Masson and D.G. Heckel. 1997. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 1640-1644.
33. Cheong H, R.K. Dhesi and S.S. Gill. 1997. Marginal cross-resistance to mosquicidal *Bacillus thuringiensis* strains in Cry 11A-resistant larvae: presence of Cry 11A-like toxins in these strains. *FEMS Microbiol Lett.* 153: 419-424.
34. Rivet, Y., M. Raymond, J.A. Rioux, A. Delalbre and N. Pasteur. 1994. Resistance monitoring in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from central-eastern France. *J. Med. Entomol.* 31: 231-239.
35. Vulule, J.M., R.F. Beach, F.K. Atieli, D.L. Mount, J.M. Roberts and R.W. Mwangi. 1996. Long-term use of permethrin-impregnated nets does not increase *Anopheles gambiae* permethrin tolerance. *Med. Vet. Entomol.* 10: 71-79.
36. Curtis, C.F. 1985. Theoretical models of the use of insecticide mixtures for the management of resistance. *Bull. Entomol. Res.* 75: 259-265.
37. Curtis C.F., N. Hill and S.H. Kasim. 1993. Are there effective resistance management strategies for vectors of human disease ? *Biol. J. Linn. Soc.* 48: 3-18.
38. Roush R. T. 1989. Designing resistance management programmes: how can you choose? *Pestic. Sci.* 26: 423-42.
39. Tabashnik, B.E. 1989. Managing resistance with multiple pesticide tactics: theory, evidence and recommendation. *J. Econ. Entomol.* 82: 1263-1269.
40. Hemingway J, R.P. Penilla, A.D. Rodríguez, B.M. James and W. Edge. 1997. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. A large scale trial in Southern Mexico. *Pest. Sci.* 51: 375-382.
41. *Idem.*
42. Penilla, R.P., A.D. Rodríguez, J. Hemingway, J. L. Torres, J.I. Arredondo-Jimenez and M.H. Rodríguez. 1998. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. Baseline data for a large-scale field trial against *Anopheles albimanus* in México. *Med. Vet. Entomol.* 12: 217-233.
43. *Idem.*

44. Brogdon, W. G. and J. C. McAllister. 1998. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in bottles. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 14(2): 159-164.
45. Brogdon W, G. and A. M. Barber. 1990. Microplate assay of glutathione S-transferase activity for resistance detection in single-mosquito homogenates. *Comp. Biochem. Physiol.* 96B: 339-342.
46. Brogdon, W. G. and J. C. McAllister. 1997. Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 13: 233-237.
47. Lengeler, C. and R.W. Snow. 1996. From efficacy to effectiveness: insecticide-treated bednets in Africa. *Bull World Health Organ.* 74: 325-332.