

Diversidad genética de *Aedes aegypti* de los departamentos Central y Cordillera del Paraguay, mediante el uso de marcadores ISSR-PCR

Genetic diversity of *Aedes aegypti* from the Central and Cordillera departments of Paraguay, using ISSR-PCR markers

Sady Brítez¹, Enmanuel Céspedes¹, María Ferreira¹, Fátima Vázquez¹, Cinthya Rodríguez¹
Leidi Herrera¹, Nilsa González-Brítez^{1,2}

¹ Universidad Nacional de Asunción, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, San Lorenzo, Paraguay.

² Universidad del Pacífico, Área de Investigación, Asunción, Paraguay.



Recibido: 25/06/2024

Revisado: 10/07/2024

Aceptado: 15/07/2024

Autor correspondiente

Nilsa González-Brítez
Universidad Nacional de Asunción,
Paraguay
gbritez.nilsa@gmail.com

Editor Responsable

Mg. Iván Barrios¹
Universidad Nacional de Asunción,
San Lorenzo, Paraguay

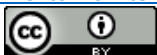
Conflictos de interés

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Fuente de financiación

El proyecto pinv15-777, fue financiado por el Programa Paraguay para el Desarrollo de la Ciencia y Tecnología (PROCIENCIA) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)- Paraguay

Este artículo es publicado bajo una [licencia de Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional](#).



RESUMEN

Introducción: *Aedes aegypti* es un insecto del grupo de los culicidos, preferencialmente antropofílico, que actúa como vector de algunos arbovirus, como del dengue, Zika y chikungunya y fiebre amarilla, con una amplia distribución a nivel de trópicos y subtropicos y responsables de brotes epidémicos importantes en el Paraguay. La urbanización, la globalización y la falta de un control eficaz, favorecen su permanencia. Estudiar la diversidad genética de esta especie permitirá evaluar la dinámica de sus poblaciones y su adaptación a los cambios ambientales, para guiar su control. **Objetivo:** Estimar la diversidad genética de las poblaciones de *Ae. aegypti* de los departamentos Central y Cordillera del Paraguay utilizando marcadores de inter-repeticiones de secuencia simple (ISSR). **Metodología:** Se seleccionaron 40 mosquitos hembra, 20 del departamento Central y 20 del departamento de Cordillera correspondientes a la región del Chaco Húmedo, Paraguay, para la amplificación de los marcadores genéticos ISSR mediante PCR, utilizando los cebadores Rhea-4, ISSR-7, ISSR1 y Ae-ISSR-6. El grado de segregación de las poblaciones estudiadas con un AMOVA y la diferenciación entre ellas con el índice de fijación F_{ST} , fueron determinadas mediante el programa Arlequín versión 3.5.2.2. **Resultados:** Se identificaron 36 loci, 90,91 % de ellos polimórficos. La mayor parte de la diferenciación genética se debió a variaciones dentro de las poblaciones y el índice de fijación entre poblaciones ($F_{ST} = 0.0432$). **Discusión:** Es posible que la diversidad dentro de las poblaciones de Central y Cordillera se deba a las características heterogéneas en cuanto a urbanismo y semi-ruralidad y la existencia de ecotonos, donde circulan estas poblaciones. Los resultados revelaron una diferenciación genética interpoblacional moderada, indicativo de que no están completamente aisladas genéticamente.

Palabras clave: ISSR-PCR; diversidad genética; *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Introduction: *Aedes aegypti* is an insect of the culicidae group, preferably anthropophilic, which acts as a vector of some arboviruses, such as dengue, Zika and chikungunya and yellow fever, with a wide distribution in the tropics and subtropics and responsible for major epidemic outbreaks in Paraguay. Urbanization, globalization and the lack of effective control favor their permanence. Studying the genetic diversity of this species will make it possible to evaluate the dynamics of its populations and its adaptation to environmental changes, to guide its control. **Objective:** To estimate the genetic diversity of *Ae. aegypti* populations in the Central and Cordillera departments of Paraguay using simple sequence inter-repeat markers (ISSR). **Methodology:** 40 female mosquitoes were selected. 20 from the Central department and 20 from the Cordillera department corresponding to the Humid Chaco region, Paraguay, were selected for amplification of ISSR genetic markers by PCR, using the primers Rhea-4, ISSR-7, ISSR1 and Ae-ISSR-6. The degree of segregation of the populations studied with an AMOVA and the differentiation between them with the F_{ST} fixation index were determined using the program Arlequin version 3.5.2.2. **Results:** Thirty-six loci were identified, 90.91% of them polymorphic. Most of the genetic differentiation was due to variations within populations and the fixation index between populations ($F_{ST} = 0.0432$). **Discussion:** It is possible that the diversity within the Central and Cordillera populations is due to the heterogeneous characteristics in terms of urbanism and semi-rurality and the existence of ecotones, where these populations circulate. The results revealed moderate interpopulation genetic differentiation, indicating that they are not completely genetically isolated.

Keywords: ISSR-PCR; genetic diversity; *Aedes aegypti*.

INTRODUCCIÓN

Los arbovirus transmitidos principalmente por mosquitos *Aedes aegypti* (Insecta, Culicidae) constituyen actualmente un reto a nivel mundial y la región de las Américas es la zona geográfica con gran impacto frente a estas enfermedades, considerando que para dengue en el 2023 se notificaron más de 4,2 millones de nuevos casos (1). La fiebre dengue está ampliamente extendida y se ha documentado la transmisión autóctona del virus (DENV) en todos los países americanos excepto en Chile y Uruguay (2).

En Paraguay, se han detectado los cuatro serotipos y en algunas temporadas circulan múltiples serotipos, incluido el DENV-1 genotipo V, DENV-2 genotipo III y el DENV-4 genotipo II (3). Si bien los departamentos Central y Cordillera son endémicos para dengue, en el año 2023 también se reportó un aumento inusual de casos de chikungunya en el país, siendo éste el mayor brote en los últimos años, con 55.508 y 3.312 en los departamentos Central y Cordillera respectivamente (4). Ambos departamentos están geográficamente ubicados en la región del Chaco húmedo, son limítrofes y mantienen un alto intercambio comercial y turístico, lo cual facilita la migración vectorial.

El vector principal, *Ae. aegypti* es un insecto, preferencialmente antropofílico muy asociado a ambientes antrópicos, el cual presenta alto grado de infestación intradomiciliar en áreas de gran densidad poblacional humana, durante los meses cálidos y lluviosos (5).

Esta especie ha sido identificada como vector del dengue, chikungunya, Zika y fiebre amarilla, todas de gran relevancia en salud pública. Posee una amplia distribución especialmente debido a factores como la urbanización descontrolada, el crecimiento poblacional, el cambio climático, las rutas migratorias, los diferentes factores sociales y principalmente la falta de control (6,7). Estos factores han condicionado el incremento de la expansión y la densidad del mosquito, y consecuentemente de la transmisión del virus, que puede ser intra y peridomiciliar (8).

La variabilidad poblacional de *Ae. aegypti* es susceptible a cambios climáticos, movilidad de grupos humanos y selección por insecticidas. El conocimiento de estos factores contribuye a la comprensión de su dinámica poblacional y abre la interrogante acerca de su estructura, lo cual facilita la estimación de los cambios genéticos entre las poblaciones de vectores, su capacidad de infección y transmisión, así como las respuestas evolutivas a cambios ambientales (9–11).

Los avances sin precedentes de la biología molecular,

en particular los que incluyen la tecnología de marcadores de ADN, han generado una riqueza de conocimientos con aplicaciones útiles en ecología y genética de poblaciones de mosquitos. Varios marcadores moleculares han servido para la diferenciación y estructura genética entre poblaciones de vectores, entre ellos se destacan los microsatélites o SSR (Simple Sequence Repeats), los polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism) o AFLP, las repeticiones de secuencia simple intergénica (ISSR) e isoenzimas (12–14).

Los marcadores ISSR, son especialmente valiosos para detectar variaciones de ADN entre regiones de microsatélites. Son económicos y fáciles de utilizar, poseen elevado polimorfismo que permiten obtener los niveles de variación que se puedan encontrar en las poblaciones (15).

En el presente trabajo se propuso estimar la diversidad genética de las poblaciones de *Ae. aegypti* de los departamentos Central y Cordillera del Paraguay, utilizando los marcadores moleculares ISSR, con la intención de brindar información útil en la vigilancia entomo- epidemiológica y en el monitoreo de posibles eventos de nuevas adaptaciones y resistencia al control químico.

METODOLOGÍA

Obtención de material biológico

El estudio fue descriptivo de corte transversal, con muestreo por conveniencia. Se colocaron ovitrampas en áreas peri domiciliarias de 20 viviendas de cada departamento, con características *ad hoc* para la presencia del vector, tales como vegetación circundante, presencia de animales domésticos, áreas húmedas y sombreadas, presencia contenedores de agua y/o enseres acumulados que servirían de potenciales criaderos del mosquito. Se incluyeron los departamentos Central y Cordillera que representan sitios endémicos y diferentes zonas geográficas de Paraguay. Las ovitrampas fueron transportadas al laboratorio y se generaron colonias independientes para cada localidad, las larvas fueron criadas en condiciones controladas de humedad (80 %) y fotoperíodo de 12 horas, hasta ser conducidas a su fase adulta, para después ser clasificadas taxonómicamente como *Ae. aegypti* (16).

Para obtener el material genético, se seleccionaron 20 hembras emergentes de cada departamento, a las cuales se les extrajo el ADN, utilizando resina Chelex al 5 %, siguiendo el protocolo estandarizado en el

laboratorio por Brítez y cols. (17). Para ello cada mosquito fue homogenizado en 240uL de la resina y 40uL de solución salina de NaCl 0,1M, utilizando un homogenizador (Sigma Aldrich, USA).

Amplificación por PCR:

De acuerdo a Soliani y cols. (13) se llevó a cabo la reacción de amplificación por PCR, habiendo sido seleccionados como cebadores a Rhea-4, ISSR-7, Ae-ISSR2, Ae-ISSR-6, ISSR1 y Pao-3 (Tabla 1), en un volumen final de 25 µL, que contenía 0,2 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 1X de Buffer MgCl₂, 0,4 µM de cada uno de los cebadores, 0,096 µg de BSA, 1 U de enzima Taq DNA Polimerasa termoestable (Taq DNA Polymerase Recombinant, Invitrogen) y 100 ng de ADN genómico. Las condiciones de ciclado

implicaron un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, hibridación T_m(°C) variable por 2 minutos como se detalla en la Tabla 1, extensión a 72°C por 1 minuto y 30 segundos, y una extensión final a 72 °C por 10 minutos. Aproximadamente el 25 % de los individuos de cada población fueron amplificados dos veces en diferentes días para confirmar la reproducibilidad.

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2 % en tampón TBE 0,5X a 100 voltios durante 2 horas. Para la verificación de tamaño de los amplicones, se utilizó el marcador de tamaño molecular de 1 Kb (Thermo Scientific, USA). El gel se visualizó bajo luz UV (312 nm) después de la tinción con bromuro de etidio.

TABLA 1. SECUENCIA DE SEIS CEBADORES DE OLIGONUCLEÓTIDOS ISSR PARA DETERMINAR LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES DE AEADES AEGYPTI DE LOS DEPARTAMENTOS CENTRAL Y CORDILLERA, PARAGUAY.

Primer	Secuencia	T _m (°C)
Rhea-4	(AC)10AG	60
ISSR-7	(AC)8YT	50
Ae-ISSR-2	(CA)8G	50
Ae-ISSR-6	(CCA)5	51
ISSR-1	(AG)8Y	50
Pao-3	(GA)9	50

Estimación de polimorfismo y análisis poblacional

Los datos recogidos en Microsoft Excel, versión 2013, permitieron construir una tabla de frecuencia de alelos, (se registró como presencia/ausencia de bandas en un locus particular), asumiendo que cada banda de un determinado tamaño molecular resultó del producto de un alelo dominante en un locus dado. A partir de estos datos binarios, se determinó la diversidad genética de las poblaciones mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA) con 1000 permutaciones mediante el programa Arlequín 3.5 (versión 2.2) por el cual se estimó el porcentaje de la variación genética total, atribuible a variaciones intra e interpoblacional. Adicionalmente se estimó la diferenciación genética por pares *F*_{ST} bajo la hipótesis nula de no diferenciación entre poblaciones.

Consideraciones éticas

El trabajo fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones en Ciencias de Salud de la Universidad Nacional de Asunción, bajo código P36/2015. La colocación de las ovitrampas se realizó con previo consentimiento de los propietarios de las viviendas y de los predios visitados. Las muestras de

insectos utilizadas fueron las mínimas necesarias para lograr resultados favorables y su manejo siguió las normas de bioseguridad establecidas en el insectario.

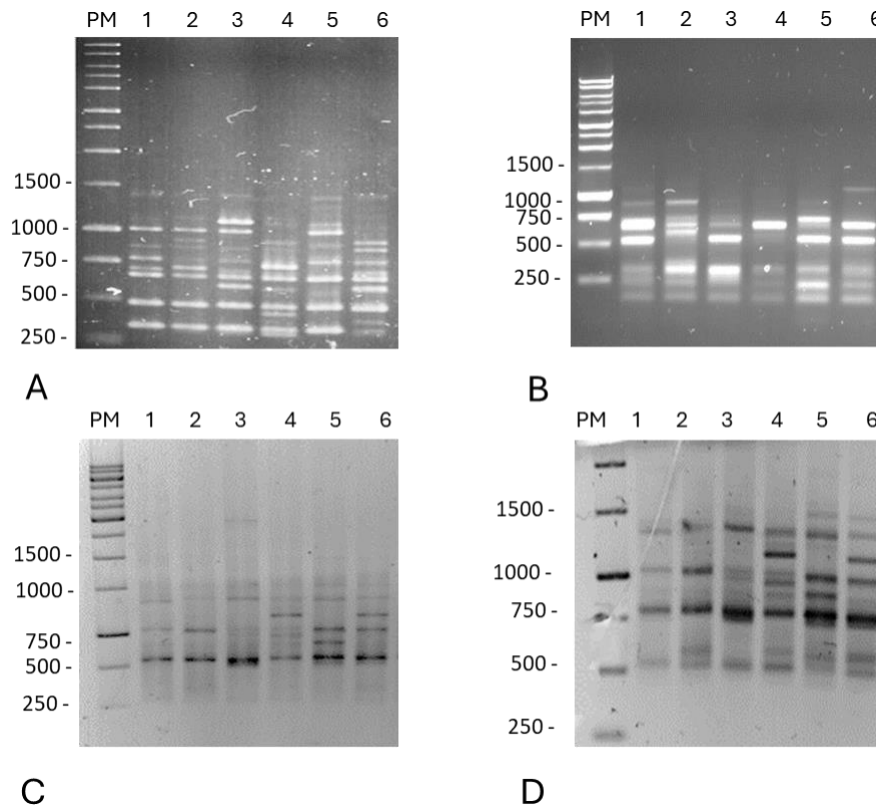
RESULTADOS

Del total de seis cebadores ISSR probados, dos cebadores mostraron amplificaciones ineficaces o no fueron compatibles con el ADN del mosquito (Ae-ISSR-2 y Pao-3).

El análisis genético reveló bandas claras y reproducibles, como producto de PCR para cuatro cebadores; ISSR-7, Rhea-4, Ae-ISSR-6 e ISSR-1 en las cuales se contaron un total de 36 bandas polimórficas, cuyos tamaños se identificaron en un rango de 250 a 1500 pb.

Las amplificaciones evidenciaron perfiles de bandas, entre 7 y 11 loci por cebador con 90,91 % de loci polimórficos y sólo una banda resultó ser monomórfica en ambas poblaciones. En la Figura 1 se observan los perfiles de bandas con los cuatro cebadores que mostraron reproducibilidad y nitidez.

FIGURA 1. PATRONES DE BANDAS ISSR OBTENIDOS CON DISTINTOS CEBADORES EN LAS POBLACIONES DE *AE. AEGYPTI* DE CENTRAL Y CORDILLERA



A) cebador ISSR-7. B) cebador RHEA-4. C) cebador Ae-ISSR-6. D) cebador ISSR-1. Para todos los apartados: PM: marcador de tamaño molecular 1000 pb (Thermo Scientific, USA); carriles 1-3: departamento Central; carriles 4-6: departamento Cordillera.

El análisis AMOVA determinó que el 95,67 % de la variación genética se debe a diferencias intrapoblacionales, mientras que solo el 4,33 % es atribuible a diferencias entre poblaciones.

Por otra parte, se observó diferenciación genética moderada entre las poblaciones de *Ae. aegypti*

DISCUSIÓN

La diversidad genética de las poblaciones puede estar condicionada por factores relacionados a cambios ambientales naturales o por actividades antrópicas sobre la dinámica poblacional. El presente estudio es el primero en el que se registra el uso de marcadores ISSR para el análisis genético de poblaciones de *Ae. aegypti* de dos departamentos de Paraguay. Esta técnica relativamente sencilla arrojó patrones altamente polimórficos y repetibles, que nos permitieron identificar la diversidad a una escala geográfica de aproximadamente 60 km.

El conocimiento de la diversidad genética dentro y entre las poblaciones de *Ae. aegypti*, un vector clave

procedentes de Cordillera y Central, demostrada por el índice de fijación (F_{ST} 0.0432) ($p=0.08016 \pm 0.00872$); los valores infieren que éstas poblaciones de mosquitos vectores no están completamente aisladas genéticamente.

de las arbovirosis que afecta de manera importante a la salud pública en todo el continente americano, especialmente en el Cono Sur, es esencial. Esta información permitiría evaluar características de la especie y plantear mejoras en la eficacia de los programas de control. De esta manera, las estrategias de control vectorial podrían ser diseñadas en función de lo que revela la composición genética y la diversidad de la población local de mosquitos (18,19).

En este estudio, la diversidad intrapoblacional alcanzó un 95,67 % de variación. El alto porcentaje observado podría deberse a la heterogeneidad presente en los departamentos con zonas semi-rurales y urbanizadas,

así como al establecimiento de subpoblaciones entre los sitios muestreados.

Por lo tanto, se sugiere que en futuros estudios sobre el vector *Ae. aegypti* se realicen muestreos a una escala geográfica más reducida. Además, es importante destacar que el vuelo de *Ae. aegypti* está condicionado por la disponibilidad de sitios adecuados para la oviposición y la alimentación, y que las hembras no suelen alejarse mucho de sus lugares de reproducción (20,21).

La diferenciación moderada entre poblaciones (F_{ST} 0.0432) refleja un flujo génico considerable entre las poblaciones de mosquitos de ambos departamentos geográficos. Aunque existe alguna diferenciación, esta no permite inferir aislamiento genético, posiblemente debido a que la región de coincidencia limítrofe sea un ecotono o a que estas poblaciones de *Ae. aegypti* comparten una historia evolutiva reciente (22). Dueñas y col. han señalado que en Argentina el efecto del comercio entre regiones ha condicionado el intercambio genético entre poblaciones de *Ae. aegypti*, y han referido que las poblaciones de ese país comparten haplotipos con países vecinos endémicos para el dengue, tales como el Paraguay (23).

En los departamentos Central y Cordillera, se sugiere que las poblaciones humanas son responsables del movimiento de los vectores debido a la movilidad diaria de los habitantes de Cordillera hacia Central por razones laborales. Además, el frecuente traslado hacia Cordillera, un corredor turístico importante enfocado en costumbres religiosas y culturales también contribuye a este fenómeno. Esta situación de intercambio turístico y/o laboral favorece el traslado humano local, junto con la migración pasiva de los vectores asociados, lo que como consecuencia conduce al aumento del riesgo epidemiológico frente a la transmisión de diversos casos de infección por arbovirus.

Algunos autores indican que en América se han dado fluctuaciones de las poblaciones de *Ae. aegypti* en función a fuertes campañas de control vectorial conducentes a erradicación con persistencia de poblaciones relictas post campaña. Sin embargo tales poblaciones vectoriales, en comparación con las mostradas en este estudio, poseen altos niveles de diversidad genética (19,23).

Lo expuesto anteriormente plantea la necesidad de realizar seguimientos sistemáticos de los patrones de resistencia y susceptibilidad a larvicidas y adulticidas de las poblaciones de mosquitos de Cordillera, como se ha realizado en el departamento Central (24). En este

sentido, la alta diversidad intrapoblacional encontrada en las poblaciones del departamento Central, sugiere que a pesar de la aplicación continua de diversas estrategias de control químico, las poblaciones de mosquitos vectores no han sido completamente eliminadas. Por otro lado, se debe mencionar que son escasos los estudios poblacionales que involucren al vector *Ae. aegypti* en regiones fronterizas y áreas de puertos, zonas donde se esperan migraciones continuas de gran diversidad de insectos. En Paraguay, se registró recientemente a una zona comercial y fronteriza ubicada en el departamento Central limítrofe con Argentina, como un área de permanente riesgo de transporte de elementos biológicos, incluyendo huevos de *Ae. aegypti* (17,25) En este contexto, se hace necesario incrementar estudios que faciliten el conocimiento de la dinámica vectorial de *Ae. aegypti* y la transmisión de los virus entre diferentes regiones del país, principalmente durante los brotes epidémicos.

Finalmente, bajo la premisa de, presencia frecuente de factores que mantienen el riesgo epidemiológico, se debería considerar la incorporación de estrategias o modificaciones diferentes en el control vectorial, que sean aplicables a nivel nacional y sostenibles en el tiempo, como las basadas en el control biológico con actinobacterias formadoras de biopelículas o a través de la inoculación de cepas de la bacteria *Wolbachia sp.* en *Ae. aegypti* (26,27).

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marina Chiappero del Instituto de Diversidad y Ecología Animal de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina; por el entrenamiento en la técnica molecular.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

SB, NG, MF: Concepción y diseño del trabajo. SB, EC, MF, CR, FV: Recolección y obtención de resultados. SB, NG: Análisis e interpretación de datos. SB, LH, NG: Redacción del manuscrito. SB, NG: Revisión del manuscrito y aprobación final.

DISPONIBILIDAD DE DATOS

Los datos de esta investigación están disponibles previa solicitud al autor de correspondencia.

REFERENCIAS

1. PAHO/WHO Data - Dengue (Internet). Disponible en: [URL](#)
2. Lopez H, Hernandez M, Hernández J, Alpuche C. Dengue in Latin America: A Persistent and Growing Public Health Challenge. En: Franco C, Santos J, editores. *Neglected Tropical Diseases - Latin America and the Caribbean*. Vienna: Springer; 2015. p. 203–24. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1422-3_11
3. Vázquez C, Alcántara LCJ, Fonseca V, Lima M, Xavier J, Adelino T, et al. Retrospective Spatio-Temporal Dynamics of Dengue Virus 1, 2 and 4 in Paraguay. *Viruses*. 2023;15(6):1275. <https://doi.org/10.3390/v15061275>
4. Dirección General de Vigilancia de la Salud I Dirección de Vigilancia y Respuesta a Emergencias en Salud Pública. Sala de Situación Arbovirosis Dengue, Chikungunya y Zika Año 2023 (Internet). 2023. [URL](#)
5. Gadelha DP, Toda AT. Biología e comportamiento do *Aedes aegypti*. *Rev Bras Malariol Doenças Trop*. 1985;29–36. [URL](#)
6. Leta S, Beyene TJ, Clercq EMD, Amenu K, Kraemer MUG, Revie CW. Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Int J Infect Dis*. 2018;67:25–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.11.026>
7. Gubler DJ. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. *Trop Med Health*. 2011;39(4SUPPLEMENT):S3–11. <https://doi.org/10.2149/tmh.2011-s05>
8. Romero D. Arbovirosis y sus consecuencias para la salud humana. 2023. [URL](#)
9. Mousson L, Vazeille M, Chawprom S, Prajakwong S, Rodhain F, Failloux AB. Genetic structure of *Aedes aegypti* populations in Chiang Mai (Thailand) and relation with dengue transmission. *Trop Med Int Health*. 2002;7(10):865–72. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2002.00939.x>
10. Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol Ecol*. 2002;11(2):155–65. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01436.x>
11. Urdaneta-Marquez L, Failloux AB. Estructura genética poblacional de *Aedes aegypti*, principal vector de los virus del dengue. *Infect Genet Evol*. 2011;11(2):253–61. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.11.020>
12. Paupy C, Orsoni A, Mousson L, Huber K. Comparisons of Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Microsatellite, and Isoenzyme Markers: Population Genetics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Phnom Penh (Cambodia). *J Med Entomol*. 2004;41(4):664–71. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.4.664>
13. Soliani C, Rondan-Dueñas J, Chiappero MB, Martínez M, García Da Rosa E, Gardenal CN. Genetic relationships among populations of *Aedes aegypti* from Uruguay and northeastern Argentina inferred from ISSR-PCR data. *Med Vet Entomol*. 2010;24(3):316–23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00890.x>
14. Endersby NM, Hoffmann AA, White VL, Lowenstein S, Ritchie S, Johnson PH, et al. Genetic Structure of *Aedes aegypti* in Australia and Vietnam Revealed by Microsatellite and Exon Primed Intron Crossing Markers Suggests Feasibility of Local Control Options. *J Med Entomol*. septiembre de 2009;46(5):1074–83. [URL](#)
15. Liu B, Wendel JF. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. *Mol Ecol Notes*. 2001;1(3):205–8. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2001.00073.x>
16. Rueda LM. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with Dengue Virus Transmission. *Zootaxa*. 2004;589(1):1–60. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.589.1.1>
17. Brites SC, Herrera L, Ferreira MC, Rolón LM, Ruiz V, González-Brítez N. Diversidad genética de *aedes aegypti* en el eje transfronterizo Central-Alto Paraná en Paraguay. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2022;39(2):170–7. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2022.392.10709>
18. Ayala AM, Vera NS, Chiappero MB, Almirón WR, Gardenal CN. Urban Populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) From Central Argentina: Dispersal Patterns Assessed by Bayesian and Multivariate Methods. *J Med Entomol*. 2020;57(4):1069–76. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa017>
19. Monteiro FA, Shama R, Martins AJ, Gloria-Soria A, Brown JE, Powell JR. Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. *PLoS Negl Trop Dis*. 18 de septiembre de 2014;8(9):e3167. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003167>
20. Reiter P. Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: implications for the efficacy of control strategies. *Vector Borne Zoonotic Dis Larchmt N*. 2007;7(2):261–73. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0630>
21. Ávalos AN, Miño MH, Anacoreto NS, Burrioni NE. Caracterización de la comunidad de mosquitos en actividad diurna en una reserva ecológica urbana. *Rev Soc Entomológica Argent (Internet)*. 2023 (citado 26 de junio de 2024);82(2). <https://www.redalyc.org/journal/3220/322074819002/html/>
22. Shi QM, Zhang HD, Wang G, Guo XX, Xing D, Dong YD, et al. The genetic diversity and population structure of domestic *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Yunnan Province, southwestern China. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):292. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2213-6>
23. Dueñas JCR, Llinás GA, Panzetta-Dutari GM, Gardenal CN. Two different routes of colonization of *Aedes aegypti* in Argentina from neighboring countries. *J Med Entomol*. 2009;46(6):1344–54. <https://doi.org/10.1603/033.046.0613>
24. Rodríguez C, Ferreira-Coronel M, Santos-Días LD, Herrera L, González-Brítez N, Rodríguez C, et al. Susceptibilidad a deltametrina de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus 1676) (Diptera: Culicidae) y determinación de áreas de influencia para su presencia en un municipio del Departamento Central, Paraguay. *Rev Científica Cienc Salud*. 2022;4(1):93–104. <https://doi.org/10.53732/rccsalud/04.01.2022.93>
25. Ferreira M, Gallego G, Galeano J, Ferreira M, Gallego G, Galeano J. Presencia de *Aedes aegypti*, vector de virus dengue y su susceptibilidad al control químico, en áreas bajo influencia de asentamientos humanos precarios en el municipio de San Antonio, Central-Paraguay. *Rep Científicos FACEN*. 2022;13(2):160–74. <https://doi.org/doi.org/10.18004/rcfacen.2022.13.2.160>
26. Bobadilla M, Palomino E. Control de *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) mediante actinobacterias formadoras de biopelículas. *Acta Biológica Colomb*. diciembre de 2021;26(3):423–38. <https://doi.org/10.15446/abc.v26n3.86966>
27. Ryan PA, Turley AP, Wilson G, Hurst TP, Retzki K, Brown-Kenyon J, et al. Establishment of wMel Wolbachia in *Aedes aegypti* mosquitoes and reduction of local dengue transmission in Cairns and surrounding locations in northern Queensland, Australia. *Gates Open Res*;3:1547. <https://doi.org/10.12688/gatesopenres.13061.2>