

Maria de Lourdes da Graça Macoris

Avaliação do nível de suscetibilidade de linhagens de *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) aos inseticidas utilizados para seu controle

Botucatu, SP
2002

Maria de Lourdes da Graça Macoris

Avaliação do nível de suscetibilidade de linhagens de *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) aos inseticidas utilizados para seu controle

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Saúde Coletiva da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP para obtenção do título de Mestre

Orientador: Antonio Luiz Caldas Júnior

Botucatu - SP
2002

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Elza Numata

Macoris, Maria de Lourdes da Graça.

Avaliação do nível de susceptibilidade de linhagens de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) aos inseticidas utilizados para seu controle / Maria de Lourdes da Graça Marcoris. – 2002.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2002.

Orientador: Antonio Luiz Caldas Júnior

Assunto CAPES: 40602001

1. *Aedes aegypti* - Resistência à inseticidas

CDD 615.951

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; Resistência à inseticidas; Controle de vetor

Agradecimentos

À minha família, pelo apoio e estímulo.

Ao Dr. Antonio Luiz Caldas Junior, pelo incentivo e orientação.

Aos colegas do Núcleo de Pesquisa da Superintendência de Controle de Endemias – Sucen, Marília, pela valiosa ajuda e suporte nas ausências.

À Dra Lídia Raquel de Carvalho, pela atenção e suporte na Análise Estatística.

Aos amigos do Departamento de Saúde Pública, pela acolhida e incentivo.

Resumo

A estratégia de prevenção de dengue tem se baseado no controle do vetor, com ênfase ao uso de inseticidas. Este tipo de controle, quando utilizado por longos períodos, pode ter sua eficácia comprometida devido ao surgimento de resistência dos vetores aos inseticidas utilizados.

A Organização Mundial de Saúde, reconhecendo o impacto deste problema no sucesso dos programas de controle, sugeriu uma padronização de bioensaios para o monitoramento periódico das populações expostas a inseticidas. Quando se propõe avaliar o nível de suscetibilidade de uma linhagem é importante que se considere a quais inseticidas ela foi exposta, uma vez que o tipo de tratamento a que estão submetidas caracteriza a pressão de seleção de linhagens resistentes. Como no Programa de Controle de Dengue do Estado de São Paulo a opção por inseticidas diferiu do programa nacional, neste estudo procurou-se avaliar o nível de suscetibilidade de algumas linhagens de *Aedes aegypti* do Estado de São Paulo de forma comparativa com linhagens do Nordeste, e avaliar a relação entre a exposição aos diferentes produtos e a presença de resistência.

Os resultados dos bioensaios indicaram haver um nível maior de resistência ao grupo dos organofosforados nas linhagens do Nordeste onde apenas este grupo de inseticida foi utilizado tanto para o controle de larvas como de adultos. Nas linhagens de São Paulo, o nível de resistência aos organofosforados é menor, porém, foi observada resistência aos piretróides em quase todas amostras estudadas enquanto que a suscetibilidade a este grupo de inseticidas ainda não está alterada na maioria das linhagens do Nordeste.

Lista de figuras, quadros e tabelas:

- Figura 1-** Relações de resistência cruzada entre as classes de inseticidas comumente usadas para o controle de vetores. **14**
- Figura 2-** Ilustração dos esquemas de bioensaios com uso de dose diagnóstica para larvas e adultos e critério de interpretação dos testes. **25**
- Figura 3-** Ilustração do esquema de bioensaios para estimativa de concentrações letais. **26**
- Figura 4-** Dendrograma - Razão de Resistência para os larvicidas temephos e fenitrothion nas linhagens de *Aedes aegypti*. **44**
- Figura 5-** Dendrograma - testes com dose diagnóstica de malathion expressos em percentual de mortalidade. **50**
- Figura 6-** Dendrograma - testes com dose diagnóstica de cipermetrina e permetrina expressos em percentual de mortalidade. **51**
- Quadro 1-** Resumo do histórico do uso de inseticidas para o controle de *Aedes aegypti* no Brasil. Estado de São Paulo e demais estados. **10**
- Quadro 2-** Relação de municípios do Estado de São Paulo, onde foi feita a amostragem de *Aedes aegypti* para avaliação de resistência, ano de infestação, período de transmissão de dengue e número de casos até 1999. **18**
- Quadro 3-** Relação de municípios da Região Nordeste, onde foi feita a amostragem de *Aedes aegypti* para avaliação de resistência, ano de infestação, período de transmissão de dengue e número de casos até 1999. **19**
- Quadro 4-** Relação de ovitrampas a serem instaladas, de acordo com o número de edificações dos municípios. **20**

Quadro 5- Relação dos municípios onde foram coletadas amostras de *Aedes aegypti* , com respectivos número de domicílios e de armadilhas instaladas. **20**

Tabela 1 -Prevalência de Dengue no período de 1994 – 1999. Municípios das regiões Nordeste e Estado de São Paulo. **28**

Tabela 2- Estimativa de Razões de Resistência segundo linhagem de *Aedes aegypti* usada como referência de suscetibilidade e inseticida utilizado. **30**

Tabela 3- Concentrações letais estimadas pela análise dos resultados de bioensaios com larvas de cepa suscetível de *Aedes aegypti*. (Rockefeller). **31**

Tabela 4- Percentual de mortalidade observado em larvas de *Aedes aegypti* segundo procedência, inseticida e dose diagnóstica utilizada. **34**

Tabela 5- Percentual Médio de mortalidade de larvas obtida com uso de dose diagnóstica proposta pela OMS, segundo tipo de inseticida e origem das larvas. **36**

Tabela 6- Percentual Médio de mortalidade de larvas obtido com uso de dose padronizada, segundo tipo de inseticida e origem das larvas. **36**

Tabela 7- Estimativa de Razão de Resistência a partir de comparação de concentrações letais para larvas.Heterogeneidade e coeficiente angular da reta dose-resposta (slope). Inseticida organofosforado temephos. **40**

Tabela 8- Estimativa de Razão de Resistência a partir de comparação de concentrações letais para larvas. Heterogeneidade e coeficiente angular da reta dose-resposta (slope).Inseticida organofosforado fenitrothion. **41**

Tabela 9- Estimativa de Razão de Resistência a partir de comparação de concentrações letais para larvas.Heterogeneidade e coeficiente angular da reta dose-resposta. Inseticida organofosforado malathion. **42**

Tabela 10- Distribuição percentual de mortalidade (a) em linhagens de *Aedes aegypti* (b) expostas à dose diagnóstica, segundo municípios e inseticidas. **46**

Tabela 11- Percentual Médio de mortalidade segundo tipo de inseticida e local de origem dos mosquitos. Estadio testado: fêmeas adultas. **49**

Tabela 12- Coeficiente de Correlação (Pearson) entre Prevalência acumulada de Dengue e indicadores Razão de Resistência (probabilidade). **53**

Tabela 13- Coeficiente de Correlação (Pearson) entre Prevalência acumulada de Dengue e Percentual de Mortalidade de adultos (probabilidade). **53**

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	3
2.1 Dengue, a doença	3
2.2 <i>Aedes aegypti</i> , o vetor	5
2.3 Controle do vetor	6
2.4 Histórico do uso de inseticidas	9
2.5 Resistência a inseticidas	11
2.6 Mecanismos de resistência	12
2.7 Panorama da resistência	15
2.8 Programas de Monitoramento da resistência	16
3. Objetivos	17
4. Metodologia	18
4.1 Regiões onde foi feita amostragem	18
4.2 Metodologia de coleta	19
4.3 – 4.5 Inseticidas avaliados, número de provas e insetos testados	21
4.6 Metodologia dos Bioensaios	22
4.7 Metodologia Estatística	27
5. Resultados e Discussão	28
5.1 Prevalência de Dengue nas regiões avaliadas	28
5.2 Padronização dos bioensaios	29
5.3 Avaliação da suscetibilidade de larvas	33
5.4 Estimativa de Razão de Resistência	38
5.5 Avaliação de suscetibilidade de adultos	45
5.6 Nível de suscetibilidade e prevalência de dengue	52
6. Conclusões	55
7. Summary	58
8. Referências Bibliográficas	59

1. Introdução

A dengue é uma arbovirose cuja importância epidemiológica tem aumentado no Brasil nas últimas décadas. Após erradicação do vetor *Aedes aegypti* na região das Américas entre as décadas de 50 e 60, foi detectada, novamente, a infestação na década de 70 e, em 1986, surgiu a primeira epidemia após o período de erradicação. Na década de 90, ocorreram grandes epidemias atingindo, principalmente, as regiões Sudeste e Nordeste do Brasil, com gradativo aumento da incidência da doença. O número de casos registrados em 1998 foi de 559.237. No verão de 2001/2002, um agravamento da transmissão é registrado com um grande número de casos ocorrendo no Rio de Janeiro e alguns estados do Nordeste.

A expansão geográfica do mosquito atinge hoje todos os estados do país. No Estado de São Paulo, a infestação foi detectada em 1985 em 9 municípios. Em 1995, já atingia 416 municípios e, em 2001, sua presença já era registrada em 483 dos 645 municípios.

Apesar de os Programas, desde seu início, preconizarem o controle integrado do vetor (SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS, SUCEN, 1992) com medidas de saneamento, educação e participação comunitária, as atividades de controle executadas têm sido centradas quase que exclusivamente no controle químico (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - FUNASA, 2002 b) com aplicação de inseticidas para o controle dos focos e eliminação de adultos.

Em 1995, uma tentativa de abordagem integral do problema foi realizada através da elaboração de um Plano Nacional para erradicação do vetor. O plano possuía três pilares: saneamento ambiental, comunicação e mobilização social e, complementarmente, o combate direto ao vetor. Previa uma política organizacional para o desenvolvimento das ações e um pacto intragovernamental com coordenação intersetorial nos três níveis de governo (municipal, estadual e federal). Além disso, estabelecia os princípios da universalidade, continuidade e sincronismo das atividades de controle do vetor.

No entanto, de todas as atividades propostas, somente foi efetivamente implantada a criação de equipes municipais cuja atribuição principal era o controle do vetor casa a casa (SUCEN, 1998), o que se realizou principalmente através do uso do controle químico focal. Houve assim, com a implantação do plano de erradicação, a partir de 1997, 1998, uma intensificação no uso de inseticidas.

A eficácia do uso de controle químico é ameaçada pelo surgimento de resistência dos mosquitos aos produtos utilizados. Tanto o desenvolvimento de resistência a inseticidas, como o comprometimento do controle têm sido mundialmente relatados para o vetor *Aedes aegypti*.

No Brasil, todos os estados da União adotaram, desde a década de 80, o uso rotineiro de um larvicida do grupo dos organofosforados. No entanto, para o controle dos mosquitos adultos, houve uma diferença no histórico dos produtos utilizados entre São Paulo e os demais estados. Em São Paulo, o uso de piretróide para o controle de adultos foi introduzido em 1989 enquanto que nos demais estados, somente em 1999. Até então, o controle de adultos foi feito com inseticidas organofosforados.

Por haver uma diferença nos grupos de inseticidas a que foram expostas as linhagens do vetor, propõe-se avaliar o nível de suscetibilidade de exemplares de *Aedes aegypti* provenientes do Estado de São Paulo comparativamente com linhagens provenientes da Região Nordeste do país.

A oportunidade de se estudar o impacto do uso de grupos distintos de inseticidas na suscetibilidade das diferentes linhagens pode contribuir para o entendimento do papel deste fator no surgimento da resistência além de subsidiar a escolha dos produtos a serem utilizados, e, assim, propiciar uma melhoria na eficácia no controle.

2. Revisão da literatura

2.1 Dengue – a doença

A dengue é uma arbovirose, transmitida pela picada do mosquito *Aedes aegypti*, que pode ser causada por quatro diferentes sorotipos. Até o momento, não há vacina contra nenhum sorotipo. Há duas formas de doença: dengue clássica com sintomas característicos de várias viroses e de pouca gravidade e dengue hemorrágica, forma mais grave que inclui desde pequenos sangramentos até grandes hemorragias e óbito.

Os primeiros registros de dengue clássica na literatura médica datam de 1779, com a transmissão no Egito e Indonésia e, em 1780, nos Estados Unidos (GUBLER & TRENT, 1993). Nas Américas, em 1827, registrou-se uma epidemia no Caribe e, de 1881 a 1922, ocorreu uma expansão geográfica da área de transmissão atingindo toda a região do Caribe e sul dos Estados Unidos (GOMEZ-DÁNTES, 1991).

No final da década de 50 foi elaborado um Plano Continental para Erradicação do vetor *Aedes aegypti* e, no início dos anos 60, o mosquito foi considerado erradicado da quase totalidade da América do Sul e de toda a América Central. Na América do Norte apenas uma pequena área no Sul dos Estados Unidos da América ainda permanecia infestada (ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD – OPS, 1983).

Na década de 80, novamente se detectou a presença deste vetor em vários países das Américas e do Caribe e, na seqüência, ocorreu transmissão de dengue em vários deles: Cuba (1981), Bolívia (1987); Paraguai e Equador (1988); Venezuela (1989) (OPS, 1989).

Hoje, a transmissão de dengue se mantém nas regiões tropicais dos países em desenvolvimento nos quais se constatam e persistem más

condições de vida, em parte causadas pela urbanização desordenada e falta de saneamento adequado. Esta situação é agravada ainda pela ausência de uma política de prevenção com ações contínuas de vigilância vetorial.

A primeira ocorrência de dengue, no Brasil, data de 1846, quando se relatou transmissão nos estados do Rio de Janeiro, Bahia, Pernambuco e Paraná. No Estado de São Paulo, há registro de epidemias em 1916 e, no Rio Grande do Sul, em 1917. Em 1923, registrou-se epidemia em Niterói. Desde esta época até 1980 não havia registro de transmissão no país. Foi em 1981/82 quando se registrou a primeira epidemia documentada clínica e laboratorialmente em Boa Vista, RR, com 12.000 casos (MARZORCHI, 1994). Em março de 1986, teve início uma grande epidemia no Rio de Janeiro e região com 80.000 casos registrados. Seguida a esta epidemia, ocorreu uma expansão das áreas com transmissão atingindo o Sudeste (São Paulo e Minas Gerais) e o Nordeste (Alagoas, Ceará, Pernambuco e Bahia) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1988). No final da década de 80 e na década seguinte, a despeito das tentativas de controle do vetor, o que se observou foi um aumento do número de municípios infestados e do número de municípios com transmissão de dengue sendo que a grande maioria dos casos se concentrou nas regiões Sudeste e Nordeste.

Atualmente, o vetor está presente nos 27 estados e houve uma expansão da área de transmissão nos últimos três anos. Em 2002, com a circulação do sorotipo 3 do vírus dengue no Rio de Janeiro, uma epidemia importante ocorreu concentrando 53 % dos 426.307 casos registrados no país até março. Ainda este ano, houve registro da circulação dos sorotipos 1, 2 e 3 em 12 estados (Pará, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Pernambuco, Paraíba e Ceará) e até a semana epidemiológica 13 houve registro de 69 óbitos.(FUNASA, MS, 2002).

No Estado de São Paulo, a comprovação da nova infestação do mosquito *Aedes aegypti* foi feita em 1985 quando um levantamento entomológico foi realizado. Em 1986, ocorreu a primeira transmissão de dengue, posterior ao período de erradicação, na região oeste do Estado (municípios de Araçatuba e Guararapes). Em 1991, ocorreu transmissão na região norte do Estado (Ribeirão Preto e região) e a epidemia se expandiu para 58 municípios. Houve uma redução da transmissão até 1994 onde se observaram casos em 25 municípios. De 1995 até 2000, o número de municípios com transmissão oscilou ao redor de uma centena, havendo, em 1999, um aumento no número de casos. Em 2001, foi registrado o maior número de casos no Estado (51.348) e também houve expansão da área de transmissão para 188 municípios (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA - CVE, 2002). A transmissão ocorre nas regiões norte e oeste do Estado e também na região litorânea, sendo observado o maior número de casos na região da Baixada Santista (cerca de 70 % dos casos do Estado). O agravamento da situação pode ser observado através dos coeficientes de incidência anuais (número de casos da doença no ano, dividida pela população do Estado multiplicado por 100.000): em 1987 foi de 0,15; em 1998 de 30,27; em 1999, de 42,36; 2000 9,54 e em 2001 138,66 casos por 100.000 habitantes. Em 2002, até a semana epidemiológica 25 já se atingiu o coeficiente de incidência de 93,18 (CVE, 2002).

2.2 *Aedes aegypti*, o vetor

O vetor de dengue, *Aedes aegypti*, é um mosquito originário da África, onde existe uma forma silvestre e uma outra forma mais adaptada às condições urbanas. Esta última forma se expandiu e está presente nas Américas (GADELHA & TODA, 1985). Seu ciclo de vida depende da presença de pequenas coleções de água onde ocorrem as fases de larva e pupa. Recipientes artificiais como latas, potes, frascos plásticos, pneus, vasos e tanques se transformam em criadouros importantes quando passam a acumular água com pouca matéria orgânica (CENTER OF DISEASE CONTROL – CDC, 1980). Uma vez que estes

tipos de recipientes são, freqüentemente, encontrados em residências e aliado ao fato deste mosquito ser altamente antropofílico, o *habitat* humano reúne todas as condições necessárias para sua proliferação.

2.3 Controle do vetor

O controle das formas imaturas pode ser feito através de ações mecânicas de eliminação ou alteração da disposição de criadouros (as formas aquáticas não sobrevivem fora da água) ou através de controle químico com uso de larvicidas. Para o controle das formas adultas, os mosquitos responsáveis pela transmissão da doença, a única estratégia de controle realizada é a química, uma vez que medidas de proteção individuais como telas e mosquiteiros têm pouca aplicabilidade prática, devido ao hábito diurno do vetor.

O emprego de inseticidas para o controle de *Aedes aegypti* pode ser realizado das seguintes maneiras:

(A) Tratamento Focal: Consiste no tratamento de recipientes contendo água que se constituem focos pela presença de larvas de *culicídeos* no seu interior e/ou em recipientes com condições para se tornarem focos. O produto geralmente utilizado é um larvicida organofosforado à base de temephos. Este larvicida, na formulação utilizada, é aderido a grânulos de areia e pela sua lenta liberação, possui efeito residual de um a três meses. Pode-se usar também larvicidas biológicos, porém estes, somente, foram utilizados no Brasil a partir de 1999.

(B) Tratamento Perifocal: aplicação de inseticida de efeito residual sobre superfícies internas e externas de recipientes e ao redor destes, em especial, em locais de acúmulo de potenciais criadouros como cemitérios, borracharias, depósito de materiais para construção e ferros-velhos. Os produtos que podem ser utilizados são do grupo dos organofosforados como malathion e fenitrothion ou do grupo dos piretróides como cipermetrina.

(C) Nebulização: Tratamento ambiental de inseticida, através de máquinas acopladas a viaturas ou portáteis (tipo moto-mochila). O alvo desta aplicação é o inseto adulto e esta técnica é geralmente usada com objetivo de matar fêmeas contaminadas, em áreas de transmissão ou de circulação de vírus. Da mesma maneira que no tratamento perifocal, podem-se utilizar produtos do grupo dos organofosforados (malathion, fenitrothion) como piretróides (cipermetrina). Inseticidas do grupo dos carbamatos (como propoxur ou bendiocarb) são pouco utilizados (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2002).

A adoção de medidas de controle mecânico para destruição de criadouros depende de motivação da comunidade em participar e de um processo de conscientização e adoção de estratégias específicas para atingir este objetivo. Na prática, o que se tem observado é que o controle se restringe ao uso de produtos químicos, tanto para o controle de focos de larvas e, principalmente, para eliminação de alados para interrupção da transmissão da doença (FUNASA, 2002).

Desde o início dos Programas de Controle e também no Plano Nacional de Erradicação do *Aedes aegypti*, as mesmas estratégias de controle químico têm sido preconizadas. (SUCEN, 1992, FUNASA, 2001). O que se diferenciou, ao longo dos anos, principalmente na vigência do Plano de Erradicação, foi a periodicidade dos tratamentos (SUCEN, 1998).

Até o presente, a norma técnica preconizada pela Fundação Nacional de Saúde é a de visitas domiciliares com eliminação de criadouros, medidas educativas e tratamento focal em ciclos bimestrais; pesquisa entomológica em pontos estratégicos em ciclos quinzenais com tratamento químico mensal ou quando necessário e, em casos de bloqueio de transmissão de dengue, controle químico focal e ambiental através de Ultra Baixo Volume com equipamento portátil num raio mínimo de nove quadras em torno do caso de dengue. Ainda de forma complementar pode ser realizada aplicação de aduicida

a Ultra Baixo Volume através de equipamento acoplado a viaturas, de forma complementar na região delimitada como de transmissão da doença. (FUNASA, 2001, 2002 b).

O Estado de São Paulo adota a norma técnica Nacional, porém com as seguintes modificações: desde 2000, o controle químico focal só é recomendado quando o agente não consegue eliminar o foco ou criadouro potencial por meio de controle mecânico ou outra solução encontrada junto ao morador. O uso de equipamento acoplado a veículos para aplicação de aduictidas a Ultra Baixo Volume está restrito a situações específicas de impossibilidade de acesso nas residências em área de transmissão de dengue.

2.4 Histórico do Uso de Inseticidas no Controle de *Aedes aegypti*

No Estado de São Paulo, desde quando foi registrada, em 1985, a presença do *Aedes aegypti* em municípios do oeste paulista, e, a despeito de todas orientações e tentativas de controle, verificou-se uma rápida expansão geográfica deste *culicídeo* do oeste para o leste do Estado (GLASSER, 2001). Medidas de controle mecânico e químico passaram a ser executadas, desde 1985, pela Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN, autarquia ligada à Secretaria de Estado da Saúde, responsável pelo controle de vetores no Estado e, nos anos que se seguiram, por Prefeituras Municipais. As medidas de controle químico rotineiramente utilizadas foram tratamento focal com temephos e controle adulticida de ação residual, também com ação larvicida (tratamento perifocal), por meio de fenitrothion, ambos inseticidas organofosforados. O malathion foi utilizado em pequena quantidade em substituição ao fenitrothion, nos anos de 1987 a 1993, em períodos de falta deste último no mercado. O fenitrothion foi utilizado até final de 1999 quando se passou a utilizar o piretróide cipermetrina.

As nebulizações térmicas e atérmicas foram utilizadas desde 1985, ficando restritas, de maneira geral, ao período de verão e outono, quando a densidade do vetor é mais elevada e ocorre maior número de casos de dengue. Foram vários os inseticidas empregados nesta atividade, destacando-se: Propoxur (1986 a 1989), malathion (1985 a 1992) e cipermetrina (1989 até 2001), os quais pertencem, respectivamente, ao grupo dos carbamatos, organofosforados e piretróides.

O histórico do uso de inseticidas, nos demais estados do Brasil, foi semelhante, exceto pela escolha dos adulticidas. São Paulo introduziu o uso de piretróide (cipermetrina) em 1989 e os demais Estados mantiveram o uso de organofosforados (malathion e fenitrothion) até 1999. Assim, a introdução do uso de piretróides para o controle das formas adultas ocorreu com uma diferença de 10 anos entre o Estado de São Paulo e os demais estados da união.

As duas opções de uso de inseticidas podem, potencialmente, comprometer a eficácia do controle uma vez que o uso contínuo de inseticidas de qualquer classe é condenado em qualquer ação de manejo da resistência (TABASHNIK, 1989).

No quadro 1, está resumido o histórico sobre uso de inseticidas para o controle de *Aedes aegypti*, com diferenciação por tipo de tratamento segundo o local de execução (Estado de São Paulo e demais Estados da União).

Quadro 1. Resumo do histórico do uso de inseticidas para o controle de *Aedes aegypti* no Brasil. Estado de São Paulo e demais Estados

Tipo de tratamento	Estado de São Paulo	Demais Estados
Focal	Temephos (OP) desde 1985	Temephos (OP) desde 1980
Perifocal	Fenitrothion (OP) de 1987 – 1999 Malathion (OP) esporadicamente	Fenitrothion (OP) de 1985 – 1999 Malathion (OP) esporadicamente
	cipermetrina (PI) 1999	cipermetrina (PI) 1999
Nebulização	Propoxur (CA) 1986 – 1989 Malathion - 1985 – 1992	Fenitrothion (OP) e Malathion (OP) 1985 – 1999
	cipermetrina (PI) a partir de 1989	cipermetrina (PI) 1999

(CA) = carbamato

(OP) = organofosforados

(PI) = piretróides

2.5 Resistência à inseticida

A capacidade de um inseto resistir a um determinado inseticida é uma característica genética que, normalmente, ocorre numa frequência muito baixa nas populações. Populações de insetos resistentes surgem através da seleção exercida pela pressão do uso de inseticidas, os quais matam os insetos suscetíveis, favorecendo o aumento da frequência de genes que conferem resistência. Deste modo, a escolha dos inseticidas utilizados nos programas de controle, assim como o tempo de uso e a seqüência de classes dos produtos são parâmetros importantes que devem ser considerados numa avaliação de suscetibilidade a inseticidas.

O ideal é que se avalie o nível de suscetibilidade de uma determinada espécie, antes da introdução do uso de um inseticida. Caso isto não seja realizado, há a alternativa de se avaliar o nível de suscetibilidade de modo comparativo com uma linhagem nunca exposta à pressão de seleção com uso de produtos químicos, cuja resposta biológica (morte ou sobrevivência) possa ser considerada padrão para a espécie. A este tipo de linhagem se denomina “linhagem suscetível”. Uma terceira alternativa para avaliação da suscetibilidade é, na ausência de uma linhagem suscetível, avaliar a mesma linhagem ao longo do tempo. Nesta última maneira, considera-se a primeira avaliação como a linha base que servirá de padrão para comparações futuras.

Para a espécie *Aedes aegypti*, existem algumas linhagens sabidamente suscetíveis aos inseticidas. Estas linhagens têm sido mantidas em insetários há muitos anos, sendo periodicamente testadas quanto à sua suscetibilidade. Uma destas linhagens é a chamada Rockefeller, a qual tem sido mantida pelo laboratório do “Centers of Disease Control” (CDC), em Porto Rico. Uma outra linhagem é a chamada Bora Bora, mantida no “Institut de Reserche pour lé Développement” (IRD) em Montpellier, França.

2.6 Mecanismos de Resistência de Insetos a Inseticidas

A resistência a inseticidas surge como o resultado de uma mutação, a qual altera um atributo fisiológico, morfológico ou comportamental de uma espécie (FERRARI, 1996). Os mecanismos de resistência podem ser divididos em quatro categorias amplas:

1. **Resistência à penetração ou mecanismo físico de resistência** - onde ocorre alteração na composição do exoesqueleto do inseto o que inibe a penetração do inseticida.
2. **Resistência metabólica** - envolvendo enzimas não específicas as quais, normalmente, detoxificam produtos químicos.
3. **Resistência por inibição do sítio de ação do inseticida** - onde o inseto tem alterado o sítio de ação do tóxico, diminuindo a sensibilidade ao mesmo.
4. **Resistência por comportamento** - quando o inseto altera seus hábitos e não entra em contato com o inseticida.

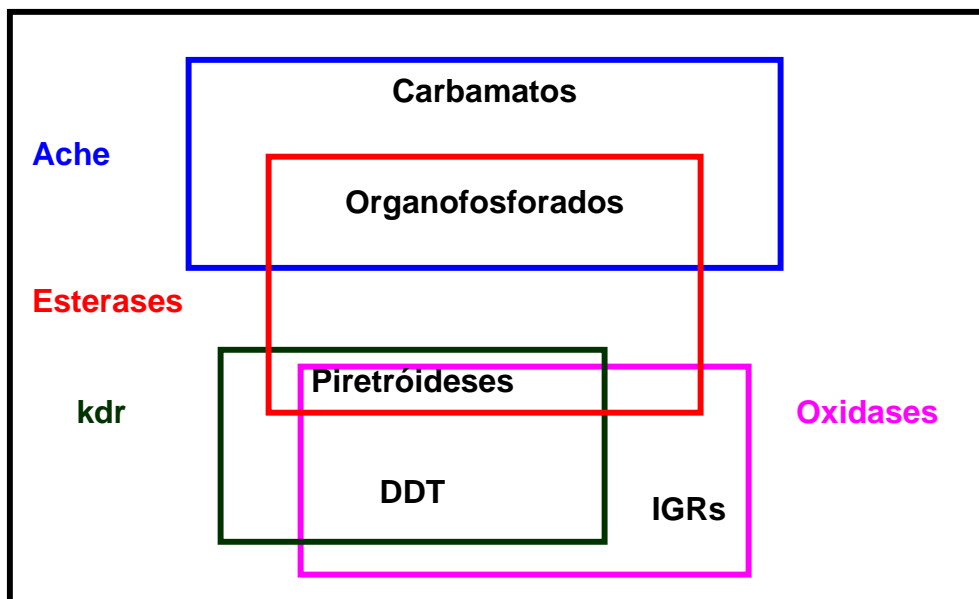
Dos tipos de resistência acima descritos, os mais freqüentemente descritos em insetos vetores são a resistência metabólica e por inibição do sítio de ação. A resistência metabólica ocorre quando níveis elevados ou a atividade alterada de enzimas envolvidas na degradação (esterases, oxidases ou glutathion-S-transferase) impedem o inseticida de atingir sua ação. Talvez o mecanismo mais comum de resistência em insetos seja devido à modificação nos níveis de enzimas esterases as quais degradam (por hidrólise da ligação éster) uma ampla variedade de inseticidas (BROGDON & MCALLISTER, 1998).

O mecanismo de resistência por diminuição da sensibilidade ao sítio de ação do inseticida ocorre quando o inseticida não se liga ao seu sítio no organismo do inseto. O alvo de ligação de inseticidas organofosforados (malathion, fenitrothion e temephos) e carbamatos (propoxur e bendiocarb) são as enzimas acetilcolinesterase presentes na sinapse dos nervos e o sítio de ação de organoclorados (DDT) e piretróides (cipermetrina, permetrina) são os canais de sódio nas membranas nervosas dos insetos. Há registro de duas alterações importantes: diminuição da sensibilidade da acetilcolinesterase e diminuição da sensibilidade do canal de sódio na membrana nervosa do inseto. Esta última confere resistência do tipo kdr (knock down resistance) observada tanto para o organoclorado DDT como para os piretróides.

A resistência causada pela diminuição da penetração do inseticida confere, geralmente, níveis baixos de resistência (FERRARI, 1996) podendo, no entanto, adquirir maior importância quando associada a outro mecanismo de resistência. Da mesma forma, a resistência por mudança de comportamento do inseto não confere níveis elevados de resistência. Este tipo tem sido relatado, principalmente, relacionado a alterações no comportamento do inseto de adentrar áreas tratadas com inseticida (SPARKS et al, 1989).

Uma vez que diferentes classes de inseticidas podem ser degradadas por mecanismos semelhantes, existe a possibilidade de ocorrência de resistência cruzada, que é a resistência observada a um inseticida que não tenha sido utilizado para o controle de uma determinada espécie, mas que possua o mesmo modo de degradação de um outro produto o qual foi utilizado e selecionou linhagens resistentes através do mesmo mecanismo. Na figura 1 estão transcritas, do resumo elaborado por Brogdon & McAllister (1998), as relações entre as classes de inseticidas e seus mecanismos de degradação. Este quadro permite a rápida visualização das possibilidades de ocorrência de resistência entre as classes de inseticidas.

Figura 1. Relações de resistência cruzada entre as classes de inseticidas comumente usadas para o controle de vetores



*Reproduzido de Brogdon & McAllister (1998). "Insecticide Resistance and Vector Control".

Ache = acetilcolinesterase

Kdr = knock-down resistance

IGRs = inibidores de crescimento

2.7 Panorama da resistência de *Aedes aegypti* aos inseticidas utilizados para seu controle

O controle da transmissão de dengue através do uso de produtos químicos traz conseqüências, ao longo do tempo, para sua própria eficácia. O uso de inseticidas, em diversas partes do mundo, propiciou o desenvolvimento de linhagens resistentes aos produtos mais intensamente utilizados. O desenvolvimento de resistência a inseticidas em mosquitos foi detectado pela primeira vez, em 1947, quando populações de *Aedes taeniorhynchus* e *Aedes sollicitans* começaram a apresentar resistência ao DDT na Flórida (BROWN, 1986). Dados mais recentes indicam que linhagens de *Aedes aegypti* presentes em diversas partes do mundo, exceto em certos países da África, apresentam resistência a DDT (WHO, 1992). A resistência a organofosforados, não evidenciada nas linhagens de *Aedes aegypti* que fizeram parte de um inquérito mundial em 1969, foi detectada na Ásia em 1972 (GEORGHIOU et al, 1987) e atualmente, apresenta-se espalhada no Caribe e regiões vizinhas incluindo América do Sul. A resistência aos piretróides sintéticos, inseticidas de utilização mais recente, já foi evidenciada nos Estados Unidos, Porto Rico, Camboja, Taiwan, Malásia e Tailândia (WHO, 1992).

No Brasil, Andrade & Modolo (1991) indicaram presença de resistência a temefos numa linhagem de *Aedes aegypti* proveniente de Campinas. Em 1994 foram evidenciadas alterações cromossômicas (monomorfismo no loco Est 6) em genes que produzem enzimas esterases, envolvidas na degradação de organofosforados, em linhagens de *Aedes aegypti* do Estado de São Paulo (DINARDO MIRANDA, 1994). Em 1995, registrou-se a diminuição da suscetibilidade a temefos em uma linhagem proveniente do Estado de Goiás (MACORIS et al, 1995) e resistência a temefos e cipermetrina em uma linhagem de Campinas (CAMPOS & ANDRADE, 2001).

2.8 Programas de monitoramento da suscetibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas utilizados para seu controle

Existem dois programas de monitoramento da suscetibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas vigentes. Um no Estado de São Paulo e outro de âmbito nacional.

A Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), implementou em 1996, um programa de avaliação anual do nível de suscetibilidade de linhagens de *Aedes aegypti* de diversas regiões paulistas. Para escolha dos municípios, cujas linhagens deveriam ser monitoradas, foram considerados dois critérios:

- Municípios onde as linhagens foram submetidas à grande pressão de seleção pelo uso intenso de inseticidas em função da transmissão de dengue e/ou,
- Municípios com grande possibilidade de recebimento de mosquitos vindos de outras áreas, através de dispersão passiva, em função da relevante importância econômica do município na região.

Através deste programa, em 1998, evidenciou-se, uma diminuição da suscetibilidade ao temephos em linhagens dos municípios de Campinas e Santos, ambos no Estado de São Paulo (MACORIS et al, 1999).

Com esta informação, deu-se início a partir do segundo semestre de 1998, a discussão da necessidade de se avaliar a situação da suscetibilidade dos vetores aos inseticidas utilizados para seu controle no Brasil. Com a formação de um grupo de trabalho, esboçou-se a proposta para implantação de um programa de monitoramento a nível nacional, durante o I Seminário Internacional de Controle de Vetores e Reservatórios (FUNASA, 1998). Como prioridade optou-se pelo monitoramento do *Aedes aegypti* devido ao registro da resistência em São Paulo e também por sua importância epidemiológica. O critério de seleção de locais onde se faria amostragem de insetos foi elevada incidência de dengue e capitais dos estados (pela importância econômica).

3. Objetivos

- **3.1 Objetivo Geral:**

- Avaliar o nível da suscetibilidade de linhagens de *Aedes aegypti* com diferentes históricos de uso de inseticida.

- **3.2 Objetivos específicos:**

- **3.2.1** Padronizar, com o uso de uma linhagem de mosquitos suscetíveis, os bioensaios com larvas para detecção de resistência de *Aedes aegypti* aos inseticidas organofosforados utilizados para seu controle;
- **3.2.2** Avaliar, através de bioensaios, o nível de suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* aos inseticidas organofosforados utilizados para seu controle em amostras de linhagens dos Estados de São Paulo, Pernambuco, Alagoas e Sergipe;
- **3.2.3** Avaliar, através de bioensaios, o nível de suscetibilidade de formas adultas de *Aedes aegypti* aos inseticidas organofosforados e piretróides utilizados para seu controle em amostras de linhagens dos Estados de São Paulo, Pernambuco, Alagoas e Sergipe;
- **3.2.4** Analisar a influência do histórico do uso de inseticidas na suscetibilidade em diferentes linhagens de *Aedes aegypti*.

4. Metodologia

4.1 Caracterização dos municípios onde foi feita a amostragem das linhagens de *Aedes aegypti* para avaliação da suscetibilidade

No Estado de São Paulo foram selecionados nove municípios que constam a seguir com as respectivas informações sobre ano de infestação, número de anos com transmissão de dengue e número de casos registrados de 1995 a 1999. Para o município de Ribeirão Preto foi considerado ainda o número de casos de dengue desde 1990 por ter havido um elevado número de casos neste período. Estes municípios são os integrantes do Programa Estadual de Monitoramento da suscetibilidade da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN):

Quadro 2. Relação de municípios do Estado de São Paulo, onde foi feita amostragem de *Aedes aegypti* para avaliação de resistência, ano de infestação, período de transmissão de dengue e número de casos até 1999

Município	Ano de infestação	Número de anos com transmissão de dengue	Casos de dengue*
Araçatuba	1985	9	1819
Bauru	1986	6	439
Barretos	1988	10	1410
Campinas	1992	4	929
Marília	1989	6	79
Presidente Prudente	1985	4	44
Ribeirão Preto	1989	9	3480**
Santos	1995	3	9574
São José do Rio Preto	1985	8	6043

*Número acumulado de casos autóctones de dengue de 1995 a 1999.

** Número acumulado de casos de dengue de 1990 a 1999.

Fonte: SUCEN/CVE-Secretaria de Estado da Saúde.

Como representação dos Estados do Nordeste, fizeram parte do estudo sete linhagens que integram a amostragem do Programa Nacional de Monitoramento da suscetibilidade, provenientes dos seguintes Municípios e

Estados com respectivas informações sobre ano de infestação, número de anos com transmissão de dengue e número de casos registrados até 1999:

Quadro 3. Relação de municípios da Região Nordeste, onde foi feita amostragem de *Aedes aegypti* para avaliação de resistência, ano de infestação, período de transmissão de dengue e número de casos até 1999

Município (estado)	Ano de infestação	Período com transmissão de dengue (em anos)	Casos de Dengue*
Maceió (AL)	1986	9	4193
Arapiraca (AL)	1988	8	2235
Recife (PE)	1994	5	35203
Jaboatão dos Guararapes (PE)	1994	4	3117
Aracaju (SE)	1996	4	14347
Barra dos Coqueiros (SE)	1996	4	2849
Itabaiana (SE)	1995	4	4360

*Número acumulado de casos autóctones de dengue

Fonte: FUNASA/MS

4.2 Metodologia para coleta das amostras de *Aedes aegypti* em cada município

Em cada um dos municípios selecionados, foi feita uma amostragem, no segundo semestre de 1999, mediante coleta de ovos de *Aedes aegypti* por meio de armadilhas de oviposição (ovitampas) (FAY & ELIASON, 1966). A metodologia utilizada foi distribuição geográfica destas armadilhas em uma “malha” (JAKOB e BEVIER, 1969) cujo número de quadrantes correspondia ao número de armadilhas previsto por município.

Para estimativa do tamanho da amostra, considerou-se o número de edificações dos municípios, critério este definido para o Programa Nacional de Monitoramento (FUNASA, 1999). O número de armadilhas previstas, segundo número de imóveis dos municípios, se encontram no quadro 4.

Quadro 4: Relação de ovitrampas a serem instaladas, de acordo com o número de edificações dos municípios

Número de edificações	Número de Ovitrapas
01 à 20.000	50
20.001 à 60.000	100
60.001 à 120.000	150
120.001 à 500.000	200
> 500.000	300

Fonte: FUNASA/MS Relatório Final Estratégias para Monitoramento da resistência.

Assim, o número de armadilhas instalado em cada município consta a seguir:

Quadro 5. Relação dos municípios onde foram coletadas amostras de *Aedes aegypti*, com respectivos número de domicílios e de armadilhas instaladas

MUNICÍPIOS	Nº DE Edificações	OVITRAMPAS
1. Aracajú	122.666	200
2. Araçatuba	41.798	100
3. Arapiraca	44.304	100
4. Barrados Coqueiros	4.313	50
5. Barretos	25.764	100
6. Bauru	76.762	150
7. Campinas	234.284	200
8. Itabaiana	18.403	50
9. Maceió	221.321	200
10. Jaboatão dos Guararapes	137.416	200
11. Marília	46.305	100
12. Presidente Prudente	45.710	100
13. Recife	416.841	200
14. Ribeirão Preto	116.984	150
15. São José do Rio Preto	85.765	150
16. Santos	102.461	150

Com o número de pontos geográficos definidos para colocação das armadilhas segundo a relação acima, a amostragem foi feita com a

instalação das mesmas pelo período de quatro semanas. A cada semana, as palhetas das armadilhas foram repostas.

A fim de padronizar os procedimentos de campo, foi realizado, no segundo semestre de 1999, um treinamento na Fundação Nacional de Saúde, em Brasília, com participação de todos os responsáveis pelos Núcleos de Entomologia de cada estado.

As equipes da SUCEN e da FUNASA responsáveis pelo controle deste vetor em cada um dos municípios integrantes do estudo ficaram incumbidas da instalação e recolhimento das armadilhas. Os laboratórios locais, em cada Estado, selecionaram as armadilhas com presença de ovos as quais foram encaminhadas ao laboratório da SUCEN em Marília onde foram formadas colônias. Para a formação das colônias, foi observada a representatividade da amostra, considerando-se o número de ovitrampas positivas por quadrante. Assim, foram postas a eclodir, números semelhantes de palhetas com ovos provenientes de cada quadrante da amostra. Os primeiros ovos postos no laboratório, chamados geração F1 ou os descendentes destes, geração F2, foram utilizados nos testes de suscetibilidade. Optou-se pelo uso das primeiras gerações para se obterem resultados próximos à situação presente em condições naturais, e impedir, assim, que a resposta biológica pudesse ser influenciada pela adaptação dos insetos às condições de laboratório, com ausência da pressão do uso de inseticidas.

4.3 Inseticidas avaliados

- Inseticidas do grupo dos organofosforados: temephos; fenitrothion e malathion.
- Inseticidas do grupo dos piretróides: cipermetrina e permetrina.

4.4 Estádios evolutivos testados, segundo inseticidas

- Larvas – temephos, fenitrothion e malathion.
- Adultos – cipermetrina, permetrina e malathion.

4.5 Número de provas e insetos testados

Foram realizadas quatro (04) provas completas por inseticida para cada método, para cada linhagem. O número de insetos testados em cada prova foi de cem (100), totalizando quatrocentos (400) insetos avaliados para cada

inseticida. O número de provas seguiu a sugestão contida nos guias da Organização Mundial de Saúde para avaliação da suscetibilidade (WHO, 1981 b,d) sendo que o número de insetos testados permite que se detecte resistência quando esta apresenta presença fenotípica em 1 % da população, segundo ROUSH & MILLER (1986).

4.6 Metodologia dos bioensaios para avaliação da suscetibilidade

Desde 1960 a Organização Mundial de Saúde (OMS), reconhecendo a necessidade de se avaliar a suscetibilidade de insetos a inseticidas, propôs uma padronização para os bioensaios, com o objetivo de permitir a comparação dos resultados (ORGANIZATION MUNDIAL DE LA SALUD - OMS, 1960). Segundo as guias da própria OMS (WHO, 1981a, b, c, d), a resistência pode ser detectada, através de bioensaios, segundo duas metodologias:

4.6.1. Exposição dos insetos a uma dose diagnóstica

Este tipo de bioensaio consiste em expor os insetos a uma dose chamada “diagnóstica” pelo fato de possibilitar a discriminação da resposta, em termos de percentual de mortalidade. Insetos suscetíveis são os que deveriam apresentar um percentual de mortalidade entre 98 a 100 % quando expostos a estas doses. Um percentual de mortalidade inferior a 80 % seria a resposta de insetos resistentes. Na situação intermediária, ou seja, mortalidade entre 80 a 97 %, estariam os insetos com menor grau de resistência e esta resposta deveria ser acompanhada no tempo para verificar se não se trata apenas de tolerância de vigor (transitória) e, portanto seriam classificadas como linhagens “sob verificação”. A confirmação desta resposta no tempo elucidaria se é um caso de resistência ou não.

A dose diagnóstica é obtida através de bioensaios onde se obtém a dose que mata 99 % dos insetos suscetíveis (no caso de *Aedes aegypti* –

uma linhagem como a Rockefeller que é sabidamente suscetível). Esta CL99 é multiplicada por um fator (2, 3 ou 4) depende do grau de discriminação que se deseje). E esta dose, agora multiplicada passa a ser a dose diagnóstica. Para o monitoramento da resistência a OMS preconiza que a dose diagnóstica seja o dobro (2 vezes) a concentração ou dose letal 99 % e que anualmente se verifique o nível de mortalidade das linhagens através da exposição a esta dose (WHO,1981 d).

A OMS propõe uma dose diagnóstica para cada vetor e para cada produto com o intuito de permitir a comparação de respostas das linhagens dos vetores nas distintas regiões do mundo. Pode-se adotar a dose proposta pela OMS (opção que tem sido feita no Brasil) ou se usar uma dose diagnóstica estimada em nível local.

Tanto o monitoramento nacional como o do Estado de São Paulo usam como parâmetro de classificação das linhagens à exposição à dose diagnóstica proposta pela OMS tanto para larvas como para testes com mosquitos adultos.

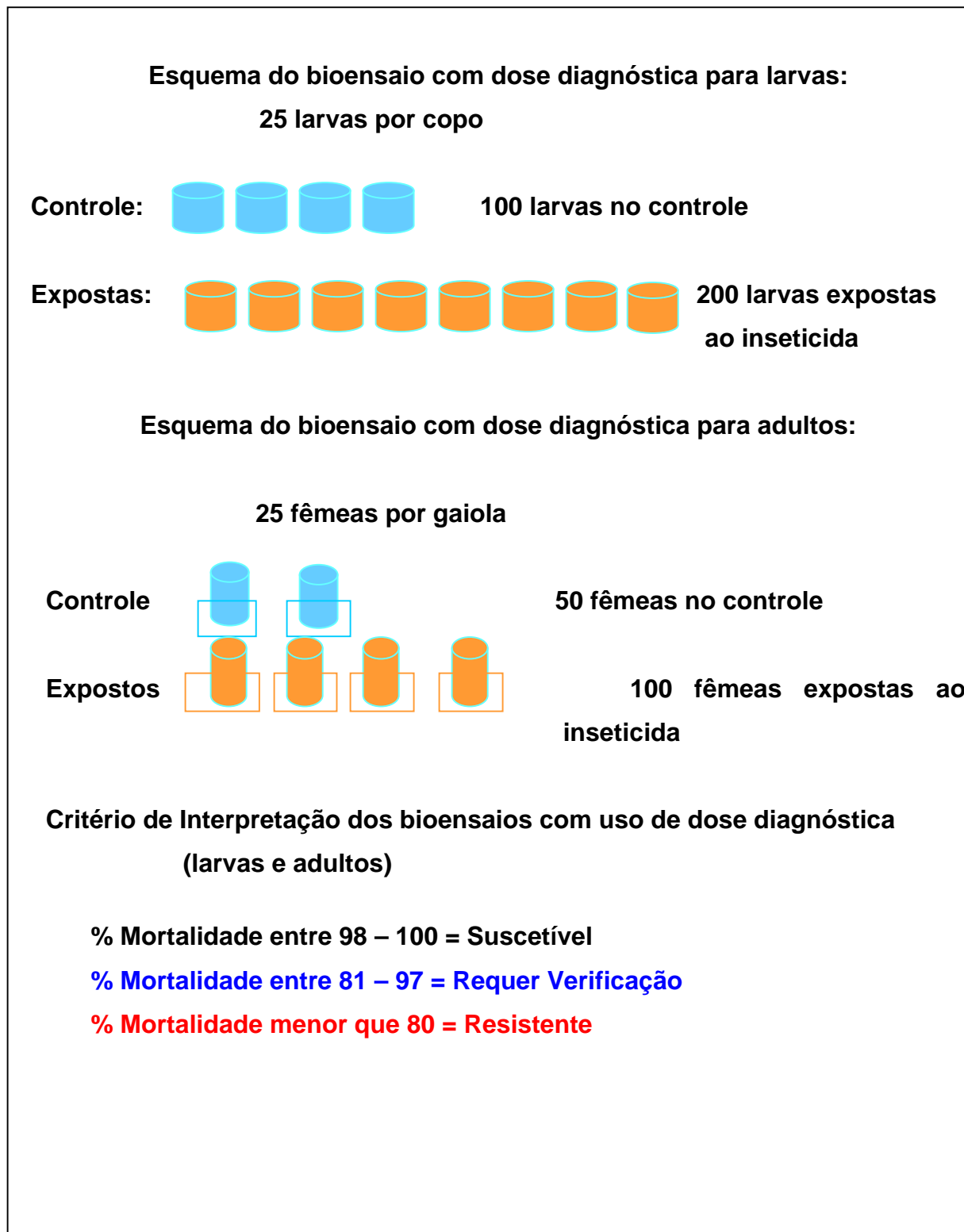
Os testes com larvas são realizados com uso de soluções de inseticidas e, portanto trabalha-se com “concentração diagnóstica” enquanto que para mosquitos adultos a exposição aos inseticidas se faz através do contato dos insetos com papéis impregnados com produtos e assim trabalha-se com “dose diagnóstica” onde a concentração de inseticida no papel e o tempo de exposição são também estabelecidos com base na resposta de uma linhagem sabidamente suscetível da espécie em estudo.

Na presente investigação, foram avaliadas as repostas das linhagens às concentrações propostas pela OMS para larvas (WHO, 1992) e também às estimadas a partir da resposta de uma linhagem suscetível (Rockefeller).

Para os mosquitos adultos foram utilizadas as doses propostas pela OMS para malathion e permetrina. Pelo fato de não haver dose proposta para cipermetrina, adotou-se a dose utilizada no Instituto Pedro Khouri (Havana, Cuba).

A seguir, na figura 2, temos a ilustração do esquema de realização dos bioensaios com dose diagnóstica para larvas e adultos assim como o de um resumo do critério de interpretação dos resultados destes testes.

Figura 2. Ilustração dos esquemas de bioensaios com uso de dose diagnóstica para larvas e adultos e critério de interpretação dos testes



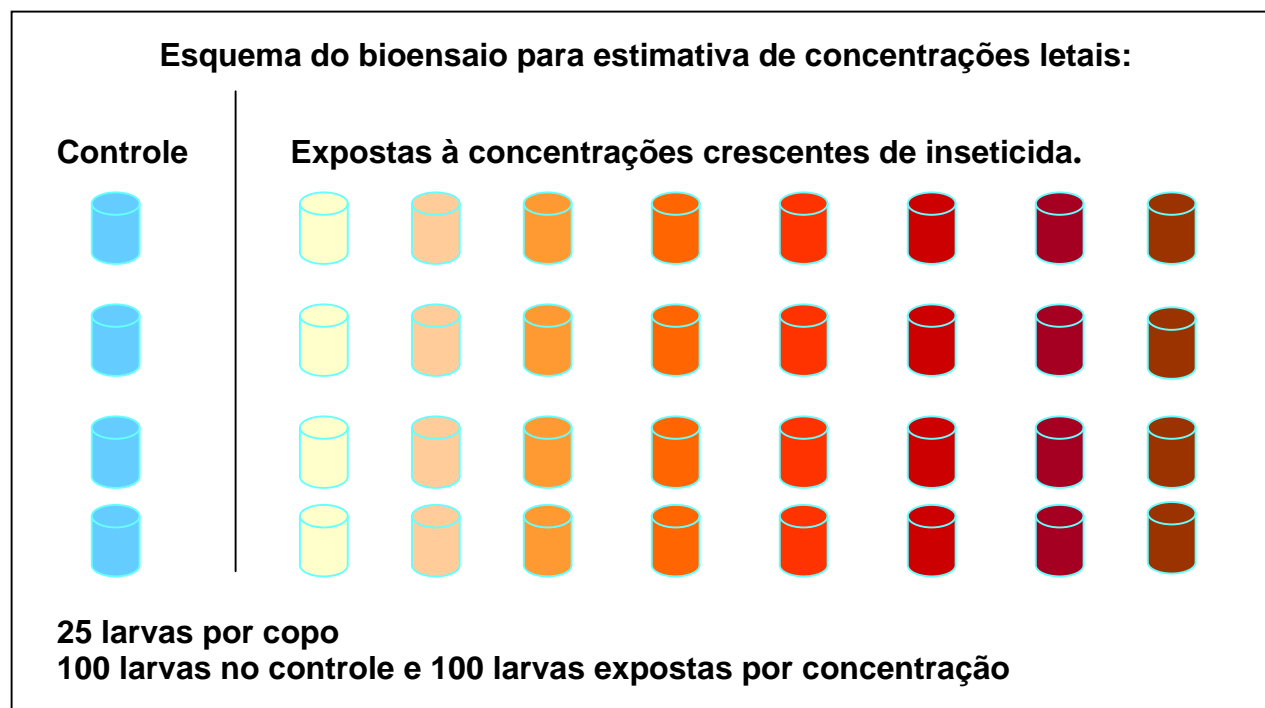
4.6.2 Avaliação da Razão de Resistência (RR)

A avaliação da Razão de Resistência (RR) é obtida pela fórmula:

$$RR = \frac{\text{CL50 ou 95 da linhagem teste}}{\text{CL50 ou 95 da linhagem suscetível}}$$

Neste estudo, para se estimar a Razão de Resistência, foram realizados bioensaios semelhantes à metodologia com uso de dose diagnóstica, porém, expondo-se as larvas a concentrações crescentes de inseticidas (WHO, 1981 a,c), conforme esquema ilustrado na Figura 3. A resposta observada, expressa em número de exemplares mortos por dose, foi submetida a tratamento estatístico e analisada através de pacote computacional Polo-PC (LEORA SOFTWARE, 1987). Através desta análise, o percentual de mortalidade foi convertido para escala de probabilidades e foram estimadas as concentrações letais 50 e 95 por cento (CL50 e CL95). A partir das concentrações estimadas, foram calculadas as Razões de Resistência, segundo a fórmula acima.

Figura 3. Ilustração do esquema de bioensaios para estimativa de concentrações letais



A padronização da estimativa de RR foi realizada em colaboração com laboratórios de referência de outros países onde se realizam estas provas, sob a coordenação da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2000). Uma vez que o objetivo das provas de suscetibilidade é a comparação da resposta de diferentes linhagens de insetos em diversas partes do mundo, é fundamental que os resultados possam ser comparáveis. Para possibilitar esta comparação, estimou-se a Razão de Resistência em diferentes regiões do mundo, a partir de uma única linhagem suscetível e com o uso de um mesmo lote de inseticidas. Os laboratórios que participaram desta avaliação foram:

- Institut de Reserche pour lé Développement” (IRD), Centre Collaborateur OMS Montpellier, França;
- Medical Entomology Unit, Faculty of Liberal Arts and Sciences Kasetsart University, Nakhon Pathom, Tailândia;
- Centre de Démoustication, Conseil Général, Fort de France, Martinica;
- Caribbean Epidemiology Center, Port of Spain, Trinidad;
- Sucen, Marília, Brasil.

4.7 Metodologia Estatística

Foram apresentados Coeficientes de Prevalência da Dengue bem como Intervalos de Confiança para a concentração média letal.

Foram realizadas Análises de Variância no esquema Fatorial, seguidas do Método de Tukey para comparações múltiplas, para comparação dos percentuais de mortalidade de larvas nas regiões. Foram realizadas análises de agrupamento das regiões utilizando a Razão de Resistência e Percentuais de Mortalidade Média com o objetivo de se detectarem agrupamentos naturais dos dados. Também foram calculados coeficientes de correlação de Pearson para estudo da correlação entre Prevalência Acumulada de Dengue e Razão de Resistência e Prevalência Acumulada de Dengue e Percentual de Mortalidade.

O nível de significância utilizado foi de 5%.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1 Prevalência de Dengue nos municípios de origem das linhagens de *Aedes aegypti* pertencentes ao estudo

Uma vez que a ocorrência de transmissão de dengue desencadeia medidas de controle químico, procurou-se medir a intensidade do uso de inseticidas através da prevalência de casos no período que precedeu a coleta dos exemplares do campo. Esta seria uma maneira indireta de se estimar a pressão de seleção a que foram submetidas as diferentes linhagens de *Aedes aegypti* estudadas. Deste modo, calculou-se o coeficiente de prevalência de dengue no período desde o início dos casos até 1999 segundo Pereira (2000). Na tabela 1, os coeficientes de prevalência no período estão relacionados em ordem crescente segundo região (Nordeste e Estado de São Paulo).

Tabela 1 Coeficiente de Prevalência de Dengue no período* (1995 -1999). Municípios das regiões Nordeste e Estado de São Paulo

Estado	Municípios	Casos de Dengue	Prevalência no período
AL	MACEIÓ	2682	359,04
AL	ARAPIRACA	741	435,77
PE	JABOATÃO DOS GUARARAPES	3713	699,21
PE	RECIFE	22377	1708,32
SE	ARACAJU	18386	4343,59
SE	ITABAIANA	4884	6563,12
SE	BARRA COQUEIROS	3090	18232,69
SP	PRESIDENTE PRUDENTE	44	24,49
SP	MARILIA	79	42,18
SP	CAMPINAS	929	100,95
SP	BAURU	439	146,31
SP	RIBEIRÃO PRETO	3480	725,28
SP	ARAÇATUBA	1819	1131,34
SP	BARRETOS	1410	1428,81
SP	SÃO JOSE RIO PRETO	6043	1521,78
SP	SANTOS	9574	2830,76

(*) soma dos casos de dengue ocorridos até 1999, divididos pela população no início de 1999 X 100.000.

5.2 Padronização dos bioensaios com larvas – Estimativa de Doses Diagnósticas a serem utilizadas para Monitoramento da resistência

5.2.1 Bioensaios com larvas

A padronização dos bioensaios com larvas, através da estimativa de concentrações letais, foi realizada como parte de um estudo colaborativo entre cinco laboratórios, sob Coordenação da Organização Mundial da Saúde. O objetivo deste estudo foi o de avaliar se o uso de soluções de inseticidas armazenadas e transportadas de modo diferentes poderia interferir na estimativa de Razão de Resistência (RR) dentro de um Programa de Monitoramento. Uma vez que a distribuição dos vetores é mundial, a possibilidade de comparação de resultados entre diversos países pode contribuir para o conhecimento de linhagens suscetíveis ou resistentes e fornecer estas informações para o controle.

Nesta etapa, avaliou-se se haveria diferença entre Razões de Resistência obtidas com uso de soluções fornecidas pela OMS enviadas sob forma de depósito de inseticida e re-suspendidas (D), de modo comparativo com solução pronta enviada e mantida em cadeia de frio (AS) e também com solução preparada no nível local. Foi estabelecido o uso da linhagem de *Aedes aegypti* “Bora Bora” como padrão suscetível para cálculo de Razão de Resistência ao nível de concentração letal 95 %. Esta linhagem foi fornecida pelo laboratório do IRD – Montpellier, França. Também foram estimadas as Razões de Resistência com a linhagem Rockefeller para verificar se havia diferenças de estimativas com as duas linhagens de referência.

Pelos dados da tabela 2, podemos verificar que, independentemente da solução de inseticida utilizado, quando estimamos Razão de Resistência na concentração letal 95 % usando qualquer uma das duas linhagens de mosquitos como referência de padrão suscetível, os valores obtidos, se encontram próximos da mesma faixa de valores para cada linhagem de

mosquito de campo. Assim, os dados demonstram que os bioensaios estão padronizados e reprodutíveis.

Tabela 2 Estimativa de Razões de Resistência segundo linhagem de *Aedes aegypti* usada como referência de suscetibilidade e inseticida utilizado

Solução	RR CL 95 Rockefeller			RR CL 95 Bora Bora		
	D	AS	Local	D	AS	Local
São José Rio Preto	2,0	2,1	2,4	2,1	1,9	1,9
Barretos	2,6	2,1	2,2	2,3	2,1	1,9
Recife	4,4	4,1	3,8	5,1	3,8	3,1
Aracaju	5,2	4,9	5,0	5,0	5,0	4,3
Itabaiana	8,3	7,9	7,4	7,2	7,1	6,9

Rockefeller – linhagem suscetível de referência

Bora Bora – linhagem suscetível de referência

D – solução preparada a partir de inseticida depositado em vidros;

AS – solução de inseticida enviada e mantida em cadeia de frio;

Local: solução preparada para ser usada no Programa Nacional de Monitoramento da Suscetibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas.

5.2.2 Estimativa de dose diagnóstica

Ainda na etapa de padronização dos bioensaios, foi estimado o valor de concentração diagnóstica a ser utilizada para as condições locais do teste. Como pode ser observado na tabela 3, o valor das concentrações diagnósticas foi obtido, dobrando-se o valor de concentração letal 99 % para a linhagem Rockefeller (padrão suscetível), seguindo sugestão da padronização proposta pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1981a, d).

A comparação entre a concentração diagnóstica estimada pela multiplicação da CL99 por dois e concentrações diagnósticas sugeridas pela OMS para inseticidas organofosforados (WHO, 1992) permite observar que a dose proposta pela OMS para fenitrothion é quatro vezes maior do que a CL99 estimada para fenitrothion e 3 vezes para temephos, enquanto que para malathion a dose proposta pela OMS é apenas 40 % maior do que a CL99.

Tabela 3: Concentrações letais estimadas pela análise dos resultados de bioensaios com larvas de linhagem suscetível de *Aedes aegypti* (Rockefeller)

INSETICIDA	Concentração letal 99 % (mg/l) (i.c.)*	Concentrações diagnósticas	
		Padronizada**	OMS***
FENITROTHION	0,0050 (0,0047 – 0,0051)	0,01	0,02
MALATHION	0,09 (0,0852 – 0,108)	0,20	0,125
TEMEPHOS	0,0040 (0,0038 – 0,0042)	0,008	0,012

* Intervalo de confiança

** Padronizada: CL99 obtida X 2

***OMS: proposta pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1992).

Optou-se por estimar as doses diagnósticas tendo como referência de suscetibilidade a linhagem Rockefeller pelo fato desta ser utilizada no Programa Nacional de Monitoramento da suscetibilidade. Além disso, por ter sido mantida em laboratório há mais de 50 anos, esta linhagem tem sido utilizada como padrão suscetível em vários estudos (MAZZARRI & GEORGHIOU, 1995; CANYON, 1999; CAMPOS & ANDRADE, 2001; RODRIGUEZ et al, 2001). Assim podemos estimar uma dose diagnóstica a partir da estimativa da CL99 desta linhagem e a posterior multiplicação desta concentração letal por dois. Os dados da tabela acima registram as concentrações letais obtidas para 3 inseticidas organofosforados.

A comparação entre as doses diagnósticas permite observar que, no caso do inseticida fenitrothion, a dose sugerida pela OMS (0,02 mg/l), se utilizada nas condições em que foram testadas as linhagens em laboratório, teria pouca chance de discriminar alguma resposta, pois ela é quatro vezes maior do que a dose que matou 99 % da linhagem suscetível. Por ser uma concentração muita elevada poderia subestimar resistências.

Para o inseticida malathion, ocorre o contrário. A dose proposta, (0,125 mg/l) por ser muito baixa, poderia levar a classificação de grande parte das linhagens como resistentes. A concentração letal 99 % para linhagem Rockefeller foi de 0.09 mg/l, muito próxima da dose diagnóstica proposta.

Com relação ao temephos, a dose proposta pela OMS (0,012 mg/l) é 3 vezes maior do que a CL99 estimada para a linhagem suscetível. Assim, do mesmo modo que o fenitrothion, porém em menor grau, o uso da dose da OMS poderia subestimar respostas compatíveis com resistência.

5.3 Avaliação da suscetibilidade de larvas através de uso de dose diagnóstica

Após a padronização das concentrações diagnósticas, foram realizados bioensaios com o uso destas doses e também com as doses propostas pela OMS. A comparação dos resultados (tabela 4) permite comprovar o descrito acima.

Com o uso da concentração sugerida pela OMS para temephos, a maioria das linhagens do Estado de São Paulo se mostra suscetível. Quando usamos a concentração estimada através da padronização dos bioensaios, conseguimos visualizar um gradiente de resposta mais variado sendo que as linhagens de Araçatuba, Barretos, Ribeirão Preto e São José do Rio Preto, classificadas como suscetíveis com o uso da dose da OMS, passam a ser classificadas “sob verificação” (mortalidade entre 80 a 97 %) com uso da dose padronizada, enquanto que a linhagem de Santos, classificada sob verificação passa a ser considerada “resistente”. Esta nova classificação é mais coerente com a intensidade de uso de inseticidas nestas cidades do Estado de São Paulo, se considerarmos o número de casos de dengue.

O mesmo se observa com as linhagens de mosquitos do Nordeste, porém o nível de susceptibilidade ao temephos é bem inferior se comparado com a resposta das linhagens do Estado de São Paulo.

Tabela 4: Percentual de mortalidade observado em larvas de *Aedes aegypti* segundo procedência, inseticida e dose diagnóstica utilizada

Concentração Diagnóstica	OMS		Padronizada		OMS		Padronizada	
	TEMEPHOS 0,012 mg/l	TEMEPHOS 0,008 mg/l	FENITROTHION 0,02 mg/l	FENITROTHION N 0,01 mg/l	MALATHION 0,125 mg/l	MALATHION 0,2 mg/l		
ARAÇATUBA	100	97,0	100	92,3	85,0	96,4		
BAURU	100	100	99,8	93,7	98,4	98,8		
BARRETOS	100	94,0	100	93,8	75,2	98,5		
CAMPINAS	100	91,0	100	99,5	86,0	99,3		
MARILIA	99,8	100	100	100	91,3	99,8		
PRES. PRUDENTE	100	100	100	100	99,2	100		
RIB.PRETO	99,2	87,5	100	94,1	83,4	98,8		
S.J. RIO PRETO	100	95,5	100	96,6	85,6	97,4		
SANTOS	80,5	79,0	99,8	75,3	52,6	86,2		
ARACAJU	64,1	32,0	98,7	41,3	43,9	95,4		
B.COQUEIROS	94,3	82,5	100	74,2	63,4	93,0		
ITABAIANA	65,3	12,5	97,6	40,0	55,4	80,7		
ARAPIRACA	62,9	17,0	97,4	89,8	61,5	93,0		
MACEIO	89,6	22,0	99,0	83,7	23,0	90,9		
JABOATÃO	84,5	15,0	98,7	85,1	54,1	85,7		
RECIFE	90,0	52,0	97,0	78,8	54,7	93,2		

- (1) OMS: concentrações sugeridas pela OMS (WHO, 1992)
- (2) Padronizada: concentrações estimadas através da padronização dos bioensaios.
- (3) Inseticidas organofosforados Temephos Fenitrothion e Malathion.
- (4) Média do total de provas realizadas, por linhagem do mosquito.

Com relação ao fenitrothion, a dose proposta pela OMS, por ser demasiadamente elevada, classifica quase todas as linhagens avaliadas como suscetíveis, sendo que apenas as amostras de Arapiraca e Recife foram classificadas como “sob verificação”. Ao usarmos a dose padronizada, novamente, podemos verificar o gradiente de resposta, sendo que apenas Campinas, Marília e Presidente Prudente seguem sendo classificadas como suscetíveis. Santos, Aracaju, Barra dos Coqueiros, Itabaiana e Recife passam a ser consideradas resistentes enquanto que as demais apresentaram resposta compatível com o status que requer verificação.

Com o malathion, a dose da OMS superestimou a resistência como previsto, por ser muito baixa. Todas as linhagens do Nordeste testadas foram classificadas como resistentes e com o uso da dose padronizada passaram a apresentar classificação que requer verificação. O mesmo ocorreu para Santos no Estado de São Paulo. As amostras de Araçatuba e São José do Rio Preto (sob verificação), Bauru e Presidente Prudente (suscetíveis), no entanto, apresentaram o mesmo nível de resposta com o uso das duas doses. A linhagem de Barretos, classificada como resistente com uso da dose da OMS, passa a ser classificada como suscetível com a dose padronizada. As demais linhagens de São Paulo foram classificadas como suscetíveis com a dose local.

Foi feita a análise dos resultados dos bioensaios com dose diagnóstica através da Análise de Variância e do teste de comparações múltiplas de Tukey para comparar a resposta apresentada para os diferentes inseticidas segundo a dose diagnóstica utilizada. No primeiro grupo, encontram-se todas as linhagens provenientes da região nordeste. Num segundo grupo estão as linhagens do Estado de São Paulo, provenientes dos municípios onde foram observados altos coeficientes de prevalência de dengue (Araçatuba, Barretos, Ribeirão Preto, São José do Rio Preto e Santos), o que reflete um uso mais intenso de inseticida. No último grupo, estão as linhagens provenientes do Estado de São Paulo onde os coeficientes de prevalência de dengue foram menores (Bauru, Campinas, Marília e Presidente Prudente) e onde houve, portanto, menor uso de inseticida se comparado aos outros dois grupos.

Na tabela 5, observamos que, quando utilizadas as doses diagnósticas sugeridas pela OMS, não se observa diferença significativa entre as médias dos percentuais de mortalidade dos três grupos de linhagens, nordeste, São Paulo alta e baixa coeficiente de prevalência de dengue para os inseticidas fenitrothion e temephos. Apenas para malathion a menor mortalidade observada para as linhagens do nordeste diferiu, significativamente, das médias de mortalidade observadas em São Paulo para os dois grupos de linhagens. Ainda dentro do grupo do nordeste a resposta ao malathion foi a única que diferiu significativamente dos demais inseticidas.

Tabela 5. Percentual Médio de mortalidade de larvas obtida com uso de dose diagnóstica proposta pela **OMS**, segundo tipo de inseticida e origem das larvas

Inseticida	Local de Origem		
	Nordeste	SP – AP	SP – BP
Fenitrothion	98,34 a A	99,96 a A	99,95 a A
Malathion	50,86 b B	76,36 a A	93,72 a A
Temephos	78,67 a A	95,94 a A	99,95 a A

- (1) Percentuais seguidos de diferentes letras minúsculas (comparação nas linhas) diferem estatisticamente ($p < 0,05$).
- (2) Percentuais seguidos de diferentes letras maiúsculas (comparação nas colunas) diferem estatisticamente ($p < 0,05$).
- (3) SP - AP Linhagens de São Paulo, municípios com alto coeficiente de prevalência de dengue.
- (4) SP - BP Linhagens de São Paulo, municípios com baixo coeficiente de prevalência de dengue.

Quando a mesma análise é feita com os resultados obtidos com uso da dose diagnóstica padronizada, observa-se uma discriminação diferente dos resultados, como pode ser observado na tabela 6.

Tabela 6. Percentual Médio de mortalidade de larvas obtido com uso de dose **padronizada**, segundo tipo de inseticida e origem das larvas

Inseticida	Local de Origem		
	Nordeste	SP – AP	SP – BP
Fenitrothion	70,41 b A	90,42 ab A	98,30 a A
Malathion	90,27 a A	95,46 a A	99,48 a A
Temephos	33,28 b B	90,60 a A	97,75 a A

- (1) Percentuais seguidos de diferentes letras minúsculas (comparação nas linhas) diferem estatisticamente ($p < 0,05$).
- (2) Percentuais seguidos de diferentes letras maiúsculas (comparação nas colunas) diferem estatisticamente ($p < 0,05$).
- (3) SP - AP Linhagens de São Paulo, municípios com alto coeficiente de prevalência de dengue.
- (4) SP - BP Linhagens de São Paulo, municípios com baixo coeficiente de prevalência de dengue.

O percentual médio de mortalidade observado para o grupo constituído por linhagens do nordeste é significativamente menor do que o observado para os dois grupos das linhagens de São Paulo para os inseticidas fenitrothion e temephos. Apenas para malathion não se observou diferença significativa entre os grupos. Quando se comparou o percentual de mortalidade dentro de cada grupo, a única diferença significativa observada foi a menor mortalidade apresentada para temephos no grupo de linhagens do nordeste.

De modo geral, analisando a resposta das linhagens à dose diagnóstica padronizada, observa-se uma menor suscetibilidade das linhagens do Nordeste aos inseticidas organofosforados. Isto pode ser atribuído à pressão do uso deste grupo de inseticida tanto para larvas como para adultos naquela região.

Em São Paulo, onde se utilizou organofosforados para larvas e piretróides para adultos, o nível de suscetibilidade das larvas aos organofosforados é maior. A menor suscetibilidade pode ser observada nas cidades onde ocorre maior número de casos de dengue (Santos, Araçatuba, Barretos, Ribeirão Preto, São José do Rio Preto) indicando que a intensificação do uso de inseticida pode influir na suscetibilidade das linhagens do vetor.

5.4 Estimativa de Razão de Resistência de larvas

Análise do nível da suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* aos inseticidas do grupo dos organofosforados

A avaliação da suscetibilidade das larvas, através do uso do indicador Razão de Resistência, permite que se estime quantas vezes é necessário aumentar a dose que mata a linhagem suscetível (Rockefeller) para se obter o mesmo percentual de mortalidade na linhagem de campo. Esta estimativa foi realizada para todas as linhagens de mosquito no nível de concentração letal 95 %. Os resultados expressos em Razão de Resistência descritos nas tabelas 7 (temephos) 8 (fenitrothion) e 9 (malathion) servem como registro para comparações futuras quando se poderá avaliar se estes níveis se mantiveram, aumentaram ou diminuíram diante das estratégias de controle químico realizadas para cada linhagem.

De modo geral, as linhagens do Nordeste apresentaram níveis de resistência maior (RR entre 3 e 10) do que os observados para as linhagens do Estado de São Paulo (RR entre 1,5 a 3). Os maiores níveis de resistência observados foram para o inseticida temephos. Isto é coerente, uma vez que é este o produto utilizado para o controle larvário. Entre as amostras de São Paulo, a que apresentou os maiores níveis de resistência foi a linhagem de Santos, município onde além de ter havido a maior prevalência de dengue no período anterior a este estudo (e, portanto maior pressão de seleção pelo uso de controle químico), é onde se localiza o porto mais importante do país e onde há maior probabilidade de introdução de *Aedes aegypti* proveniente de outras regiões onde já se observou elevado nível de resistência a inseticidas.

Os níveis observados nas linhagens mais resistentes do Nordeste, ainda podem ser considerados de baixo (ao redor de 3) a moderados (entre 5 e 10) se comparados com os observados por Rawlins (1990 e 1995) para temephos em alguns lugares do Caribe como Antigua (RR 29,2) em amostras de larvas coletadas entre 1988 e 1989. Ainda neste estudo, as amostras, coletadas

em Porto Rico, Jamaica e Trinidad, já apresentavam níveis próximos de 10 já nesta época.

O mesmo Rawlins (1998) estudou a distribuição espacial da resistência ao temephos no Caribe em 102 linhagens de 16 países compreendendo a região de Suriname e Ilhas Caribenhas até Bahamas e encontrou níveis variáveis de razão de resistência. Novamente a linhagem de Antigua apresentou junto com amostra de Santa Lucia e Tortola RR entre 5 e 18 enquanto que em outro grupo de países como Anguilla e Curaçao os mosquitos apresentaram níveis variáveis de resistência (entre 2,5 a 10,6) e num terceiro grupo de países incluindo Barbados Jamaica e Suriname apresentaram consistentemente níveis baixos de resistência (RR entre 1 a 5).

No Caribe, foram registrados ainda níveis elevadíssimos de resistência a temephos em linhagens de *Aedes aegypti* provenientes de Tortola, Ilhas Virgens (RR 46,8) (WIRTH & GEORGHIOU, 1999).

Na Venezuela, Mazzarri & Georghiou (1995) registraram níveis baixos de resistência em três amostras de *Aedes aegypti* provenientes do estados de Aragua e Falcon, com RR menor que cinco (5) para temephos e malathion. Coletas realizadas em 1997 no mesmo estado de Aragua (RODRIGUEZ et al, 2001) ainda apresentavam RR menor que 5 para temephos enquanto que em Apure e já se observava RR de 11,1 vezes.

O impacto que a resistência ao temephos pode causar no controle larvário é a redução no tempo de seu efeito residual (RAWLINS, 1998). Isto já foi observado em situação de campo no Rio de Janeiro (FUNASA, 1999) e, também, em testes simulando uso de campo na linhagem de Santos, SP (SUCEN, 2000). Por este motivo, recomenda-se que se acompanhe o nível de resistência ao temephos com avaliações periódicas do impacto de seu uso em situações de campo, nas linhagens que apresentaram diminuição de suscetibilidade nos testes em laboratório.

Tabela 7. Estimativa de Razão de Resistência a partir de comparação de concentrações letais para larvas. Heterogeneidade e coeficiente angular da reta dose-resposta (slope). Inseticida organofosforado Temephos

Linhagem	CL. 50 mg/l	CL.95 mg/l	R.R CL. 50	R.R CL. 95	h	slope
Rockefeller	0,0023 (0,0022-0,0023)	0,0034 (0,0032-0,0035)	1	1	1,81	9,384
Araçatuba	0,0048 (0,0045 - 0,0050)	0,0074 (0,0069 - 0,0081)	2,1	2,2	0,67	8,700
Barretos	0,0040 (0,0037-0,0041)	0,0080 (0,0075-0,009)	1,7	2,4	0,95	5,301
Bauru	0,0031 (0,0030 - 0,0032)	0,0050 (0,0047 - 0,0053)	1,3	1,5	1,30	7,937
Campinas	0,0042 (0,0040-0,0044)	0,0090 (0,0087-0,01)	1,8	2,6	1,82	4,713
Marília	0,0037 (0,0036-0,0037)	0,0057 (0,0055-0,006)	1,6	1,7	0,45	8,633
Presidente Prudente	0,0027 (0,0026-0,0027)	0,0041 (0,004-0,0043)	1,2	1,2	0,67	8,886
Ribeirão Preto	0,0053 (0,0051-0,0054)	0,0095 (0,009-0,01)	2,3	2,8	0,38	6,462
Santos	0,0061 (0,0058-0,0063)	0,010 (0,0100-0,0110)	2,7	2,9	0,56	6,828
São José Rio Preto	0,0041 (0,0039-0,0043)	0,008 (0,0075-0,0084)	1,8	2,4	0,77	5,803
Araçajú	0,0095 (0,0092-0,0099)	0,018 (0,017-0,019)	4,1	5,3	0,30	6,122
Barra dos Coqueiros	0,0057 (0,0055-0,0059)	0,0110 (0,010-0,012)	2,5	3,2	0,35	5,598
Itabaiana	0,0130 (0,0130-0,0140)	0,0290 (0,0260-0,0320)	5,7	8,5	0,36	4,966
Jaboatão Guararapes	0,01039 (0,0100-0,01075)	0,01585 (0,01499-0,0170)	4,5	4,7	2,30	8,962
Recife	0,0079 (0,0077-0,0081)	0,0130 (0,0120-0,0140)	3,4	3,8	0,39	7,358
Arapiraca	0,0101 (0,0098-0,0104)	0,0115 (0,0145-0,0161)	4,4	3,4	0,53	9,408
Maceió	0,0110 (0,010-0,011)	0,0190 (0,018-0,02)	4,8	5,6	0,21	6,519

Tabela 8. Estimativa de Razão de Resistência a partir de comparação de concentrações letais para larvas. Heterogeneidade e coeficiente angular da reta dose-resposta (slope).Inseticida organofosforado fenitrothion

Linhagem	CL. 50 mg/l	CL.95 mg/l	R.R CL.50	R.R CL.95	h	slope
Rockefeller	0,0021 (0,0020-0,0022)	0,0038 (0,0035-0,004)	1	1	0,25	6,796
Araçatuba	0,005 (0,0049-0,0052)	0,0082 (0,0078-0,0087)	2,4	2,2	0,67	7,718
Barretos	0,0061 (0,006-0,0063)	0,0093 (0,009-0,0097)	2,9	2,4	0,32	8,955
Bauru	0,0039 (0,0037 - 0,0040)	0,0057 (0,0053 - 0,0063)	1,9	1,5	1,00	9,914
Campinas	0,0039 (0,0037-0,004)	0,0071 (0,0067-0,0076)	1,9	1,9	0,09	6,178
Marília	0,0041 (0,0039-0,0042)	0,0069 (0,0064-0,0077)	2,0	1,8	0,65	6,136
Presidente Prudente	0,0039 (0,0037-0,0040)	0,0059 (0,0056-0,0064)	1,9	1,6	0,90	8,895
Ribeirão Preto	0,0056 (0,0053 - 0,0060)	0,010 (0,0093 - 0,012)	2,7	2,6	1,84	6,437
Santos	0,0058 (0,0054-0,0062)	0,012 (0,01-0,014)	2,8	3,2	0,29	6,822
São José Rio Preto	0,006 (0,0058-0,0061)	0,0102 (0,0097-0,0108)	2,9	2,7	0,80	7,140
Aracajú	0,0079 (0,0076 - 0,0082)	0,014 (0,013 - 0,016)	3,8	3,7	1,76	6,535
Barra dos Coqueiros	0,0085 (0,0082-0,0087)	0,0141 (0,0132-0,0153)	4,0	3,7	0,72	7,456
Itabaiana	0,006 (0,0057 - 0,0062)	0,011 (0,010 - 0,012)	2,9	2,9	1,70	5,936
Jaboatão Guararapes	0,0065 (0,0063 - 0,0067)	0,011 (0,010-0,012)	3,1	2,9	0,15	7,495
Recife	0,0075 (0,0072-0,0078)	0,017 (0,016-0,018)	3,6	4,5	0,31	4,729
Arapiraca	0,0065 (0,0063-0,0068)	0,0142 (0,0132-0,0155)	3,1	3,7	1,56	4,869
Maceió	0,0046 (0,0044 - 0,0048)	0,009 (0,008 - 0,01)	2,2	2,4	1,87	5,668

Tabela 9- Estimativa de Razão de Resistência a partir de comparação de concentrações letais para larvas. Heterogeneidade e coeficiente angular da reta dose-resposta (slope) Inseticida organofosforado malathion

Linhagem	CL. 50 mg/l	CL.95 mg/l	R.R CL.50	R.R CL. 95	h	slope
Rockefeller	0,040 (0,0039 - 0,0041)	0,0690 (0,066 - 0,073)	1	1	0,48	7,097
Araçatuba	0,0938 (0,0905-0,0971)	0,1934 (0,1815-0,2082)	2,3	2,8	1,99	5,236
Barretos	0,105 (0,1005-0,1093)	0,1876 (0,1745-0,1772)	2,6	2,7	2,26	6,603
Bauru	0,0828 (0,0799 - 0,0860)	0,1595 (0,1479-0,1747)	2,1	2,3	2,00	5,783
Campinas	0,0877 (0,0852- 0,0901)	0,1426 (0,1357 - 0,1514)	2,2	2,1	1,83	7,791
Marília	0,0903 (0,0863- 0,0946)	0,1859 (0,1708 - 0,2056)	2,3	2,7	1,51	5,246
Presidente Prudente	0,074 (0,0722-0,0759)	0,1208 (0,1143-0,1294)	1,9	1,8	1,17	7,740
Ribeirão Preto	0,0841 (0,0790-0,0885)	0,1602 (0,1500-0,1744)	2,1	2,3	1,84	5,879
Santos	0,1046 (0,1001-0,1088)	0,2194 (0,2062-0,2362)	2,6	3,2	0,94	5,111
São José Rio Preto	0,0701 (0,0666-0,0735)	0,1465 (0,1352-0,1620)	1,8	2,1	0,91	5,145
Aracajú	0,1262 (0,1207 -0,1313)	0,2558 (0,2389 - 0,2785)	3,2	3,7	0,45	5,365
Barra dos Coqueiros	0,1053 (0,1013-0,1092)	0,1922 (0,1814-0,2059)	2,6	2,8	0,48	6,298
Itabaiana	0,1626 (0,1545-0,1705)	0,3806 (0,3471-0,4270)	4,1	5,5	0,22	4,455
Jaboatão Guararapes	0,1118 (0,1020-0,1199)	0,2229 (0,2060-0,2476)	2,8	3,2	0,93	5,491
Recife	0,1359 (0,1225-0,1468)	0,5277 (0,4209-0,7581)	3,4	7,6	1,53	2,793
Arapiraca	0,0971 (0,0875-0,1047)	0,2198 (0,2000-0,2519)	2,4	3,2	2,35	4,635
Maceió	0,1715 (0,1650-0,1758)	0,3058 (0,2859-0,3328)	4,3	4,4	2,08	6,825

Além do registro do nível de suscetibilidade através de estimativa de Razão de Resistência, a comparação entre as diferentes linhagens das larvas foi feita através da análise de agrupamentos com o objetivo de se detectarem agrupamentos naturais dos dados. Esta seria uma maneira de classificar as linhagens pela observação da sua distância da linhagem suscetível e caracterizar grupos com níveis semelhantes de suscetibilidade. Os resultados desta análise estão expressos em Dendrogramas (árvores aditivas) para inseticidas dos grupos dos organofosforados utilizados na rotina de controle larvário (temephos e fenitrothion).

Quando observamos o agrupamento resultante para a razão de resistência aos larvicidas estudados (Figura 4), observamos que as linhagens mais suscetíveis foram Bauru, Presidente Prudente e Marília as quais foram agrupadas junto com a linhagem suscetível Rockefeller, apresentando Razão de resistência (RR) inferior a dois (2).

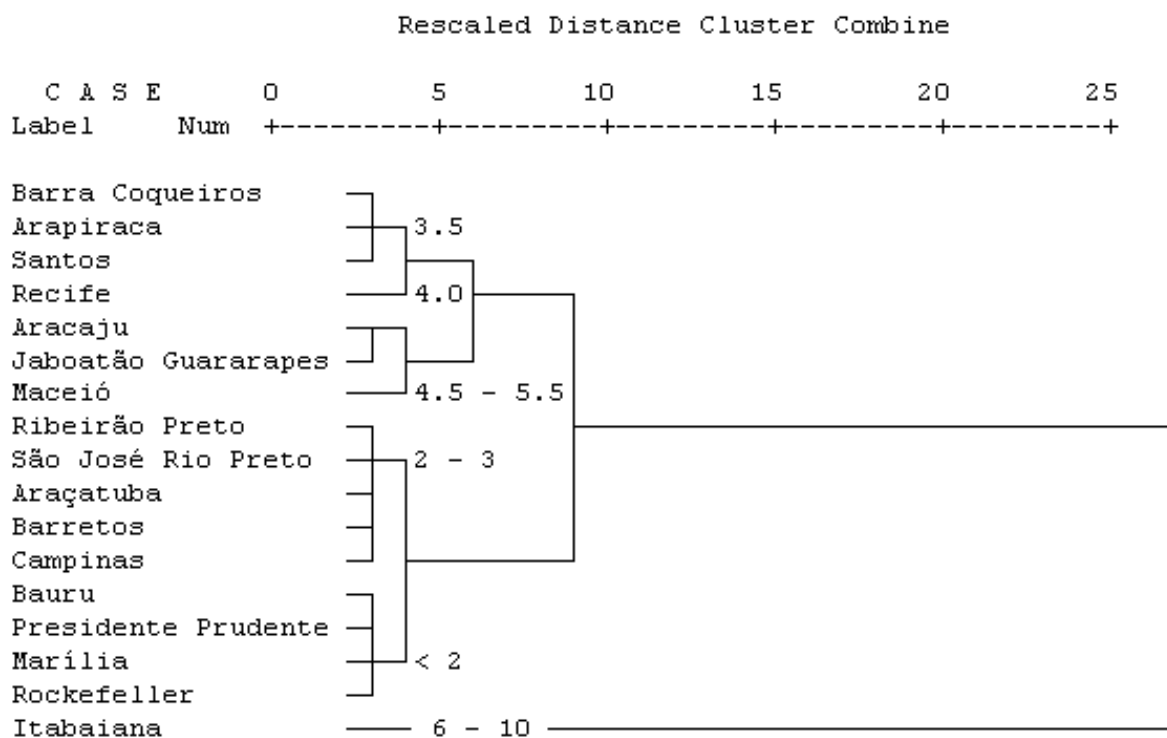
Num segundo grupo, com linhagens somente de São Paulo temos RR entre dois (2) e três (3). Os agrupamentos mais distantes da linhagem suscetível foram formados por mosquitos provenientes de municípios do Nordeste onde as RR foram superiores a três (3). Apenas a linhagem proveniente do município de Santos (SP) foi agrupada neste nível. Esta linhagem apresentou os níveis mais elevados de resistência a organofosforados em São Paulo. A linhagem mais distante, proveniente do Nordeste, foi Itabaiana.

O nível mais alto de resistência aos organofosforados foi, portanto, observado nas linhagens provenientes do Nordeste onde os inseticidas deste grupo foram usados tanto para as formas imaturas (larvas) como adultas do vetor nas duas atividades (controle perifocal e nebulização). No Estado de São Paulo, este grupo de inseticida foi usado, principalmente para larvas, sendo a nebulização feita com uso de piretróides. O diferencial de uso pode ter influenciado o nível de resistência observado.

Figura 4 Dendrograma obtido pela análise de agrupamentos dos resultados de Razão de Resistência para os larvicidas temephos e fenitrothion nas linhagens de *Aedes aegypti*

* * * * * H I E R A R C H I C A L C L U S T E R A N A L Y S I S * * * * *
RR FENITROTHION TEMEPHOS (LARVAS)

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)



5.5 Avaliação da suscetibilidade das formas adultas das linhagens de *Aedes aegypti* aos inseticidas usados para o seu controle

Desde o início dos Programas de Controle de Dengue, na década de oitenta, o controle das formas adultas (fêmeas) recomendado pelo Ministério da Saúde, através da Fundação Nacional de Saúde, é realizado com o uso de inseticidas do grupo dos organofosforados tanto para tratamentos perifocais como para nebulizações. Em todo o Brasil, iniciou-se o controle de adultos, com tratamentos com os organofosforados, malathion e fenitrothion. Em 1989, o Estado de São Paulo, através da Superintendência de Controle de Endemias, optou por introduzir um inseticida do grupo dos piretróides para ser utilizado em nebulizações. Assim, desde então, somente no Estado de São Paulo, utilizou-se o piretróide cipermetrina para nebulizações e fenitrothion (organofosforado) para tratamento perifocal. Em 1999, uma nova recomendação do Ministério da Saúde introduz o uso do piretróide cipermetrina para todo o Brasil tanto para o uso em nebulizações como em tratamento perifocal. Deste período em diante, também no Estado de São Paulo, passa-se a usar, exclusivamente, cipermetrina para todos os tratamentos de adultos.

Uma vez que as coletas dos exemplares deste estudo foram realizadas no segundo semestre de 1999, a exposição das linhagens de mosquitos do Nordeste foi predominantemente a organofosforados, enquanto que os mosquitos de São Paulo foram expostos a um controle com o piretróide cipermetrina por cerca de 10 anos.

Os bioensaios realizados para avaliação da suscetibilidade dos mosquitos aos adulticidas utilizaram as doses diagnósticas recomendadas pela OMS para malathion e permetrina, enquanto que para cipermetrina a dose adotada foi a recomendada pelo Instituto Pedro Kouri em Cuba, uma vez que não há recomendação de dose diagnóstica pela OMS para este produto. Não houve estimativa de dose a ser utilizada, pois a técnica de impregnação de papéis com

inseticida ainda não está estabelecida no laboratório onde foram feitos os testes deste estudo.

Tabela 10. Distribuição percentual de mortalidade (a) em linhagens de *Aedes aegypti* (b) expostas à dose diagnóstica, segundo municípios e inseticidas

Inseticida	CIPERMETRINA	PERMETRINA	MALATHION
Dose	36,5 mg i,a,/m ² 0,1% 1 hora	91,25 mg i,a,/m ² 0,25% 1 hora	292 mg i,a,/m ² 0,8% 1 hora
Rockefeller	99,0	98,4	99,5
Estado São Paulo			
ARAÇATUBA	71,7	7,5	73,0
BAURU	74,7	25,3	98,3
BARRETOS	71,4	5,0	100
CAMPINAS	88,0	26,3	91,4
MARILIA	87,7	41,0	99,7
PRES, PRUDENTE	72,8	69,0	100
RIB,PRETO	56,4	6,7	82,6
S,J, RIO PRETO	50,1	10,0	88,3
SANTOS	42,2	12,0	42,6
Nordeste			
ARACAJU	80,3	95,4	79,7
B,COQUEIROS	90,4	95,3	81,3
ITABAIANA	93,0	59,5	61,0
ARAPIRACA	97,0	94,3	81,7
MACEIO	90,0	94,3	96,3
JABOATÃO	76,3	99,0	87,5
RECIFE	75,9	79,0	66,3

(a) Média do total de provas realizadas, por linhagem de mosquito.

(b) Estadio e sexo testado: mosquito adulto (fêmeas)

Segundo o critério de interpretação proposto pela OMS para provas com uso de dose diagnóstica, considera-se:

Percentual de mortalidade entre 98 a 100 % - Linhagem Suscetível

Percentual de mortalidade entre 80 a 97 % - Requer Verificação (ou acompanhamento)

Percentual de mortalidade inferior a 80 % -Linhagem Resistente

Pelos resultados observados na tabela 10, verifica-se que a resposta de todas as linhagens de São Paulo está comprometida para os inseticidas do grupo dos piretróides. O inseticida permetrina nunca foi utilizado em programas de saúde pública, apesar de ser, freqüentemente, encontrado em produtos comerciais de uso doméstico. Mesmo considerando que possa haver seleção de mosquitos resistentes pelo uso doméstico, o mais provável é que esteja ocorrendo um fenômeno de resistência cruzada e assim, as linhagens de mosquitos, expostas a cipermetrina, tenham desenvolvido resistência a outros piretróides.

Para as linhagens do Nordeste, a resposta observada foi mais compatível com o padrão suscetível exceto para as linhagens de Itabaiana (permetrina) e Recife (cipermetrina e permetrina). Uma possível explicação reside no registro de que a resistência ao temephos (organofosforado) pode conferir resistência cruzada à permetrina. Wirth e Georghiou (1999) selecionaram uma linhagem de *Aedes aegypti* resistente a temephos e observaram a ocorrência de resistência cruzada ao piretróide permetrina. As baixas mortalidades apresentadas pelas linhagens de Itabaiana (SE) e Recife (PE) a permetrina nos testes podem, portanto, ser atribuídas a este fenômeno de resistência cruzada uma vez que permetrina não foi utilizada no Nordeste para o controle de dengue e também pelo fato destas linhagens terem apresentado Razões de Resistência elevadas para temephos. Itabaiana apresentou a maior Razão de Resistência para temephos (8,5 vezes) conforme descrito na tabela 7.

Quanto aos inseticidas organofosforados, as provas com o malathion indicam que ainda se pode contar com esta classe de produto para controle de adultos para o Estado de São Paulo, enquanto que, para as linhagens do Nordeste, já se observa um nível mais baixo de suscetibilidade. Entre as linhagens do Estado de São Paulo, apenas as provenientes de Araçatuba e Santos tiveram resposta alterada para malathion. Nestas duas cidades houve uso deste produto, de modo diferente do resto do Estado. Em Santos, havia controle com organofosforado para adulto também, pois a região portuária era área de controle da Fundação Nacional de Saúde até 1999. Em Araçatuba, desde 1986

havia transmissão de dengue e neste período, até 1989, o controle foi feito com uso dos organofosforados malathion e fenitrothion na atividade de nebulização além do uso de fenitrothion para controle de formas adultas do vetor na atividade de controle perifocal.

A análise dos resultados dos bioensaios com mosquitos adultos, através da Análise de Variância, visou comparar a resposta apresentada para os diferentes inseticidas. As linhagens foram agrupadas segundo coeficiente de prevalência: no primeiro grupo foram colocadas todas as linhagens provenientes da região nordeste, no segundo grupo as linhagens do Estado de São Paulo, porém provenientes dos municípios onde foram observados altos coeficientes de prevalência de dengue (Araçatuba, Barretos, Ribeirão Preto, São José do Rio Preto e Santos) e no terceiro grupo estão as linhagens provenientes do Estado de São Paulo onde os coeficientes de prevalência de dengue foram menores (Bauru, Campinas, Marília e Presidente Prudente) e onde houve, portanto, menor uso de inseticida se comparado aos outros dois grupos.

Os resultados desta análise, expressos na tabela 11, mostram que para os inseticidas do grupo dos piretróides, cipermetrina e permetrina, o percentual de mortalidade apresentado pelas linhagens do Nordeste (onde este grupo não foi usado na rotina de controle) é significativamente maior do que o observado para o grupo de linhagens de mosquitos de São Paulo (grupos de alta e baixa prevalência), onde a cipermetrina foi usada por 10 anos consecutivos.

Para o organofosforado malathion, a média de mortalidade não apresentou diferença significativa entre os grupos (teste de Tukey), apesar de ser possível observar níveis de suscetibilidade diferentes entre as linhagens testadas. Exceto nas linhagens de Araçatuba e Santos, para todas as demais linhagens do Estado de São Paulo, a resposta foi compatível com classificação de suscetível, enquanto que nas linhagens do Nordeste, nenhuma foi classificada como suscetível, sendo 3 classificadas como resistentes e 4 sob verificação.

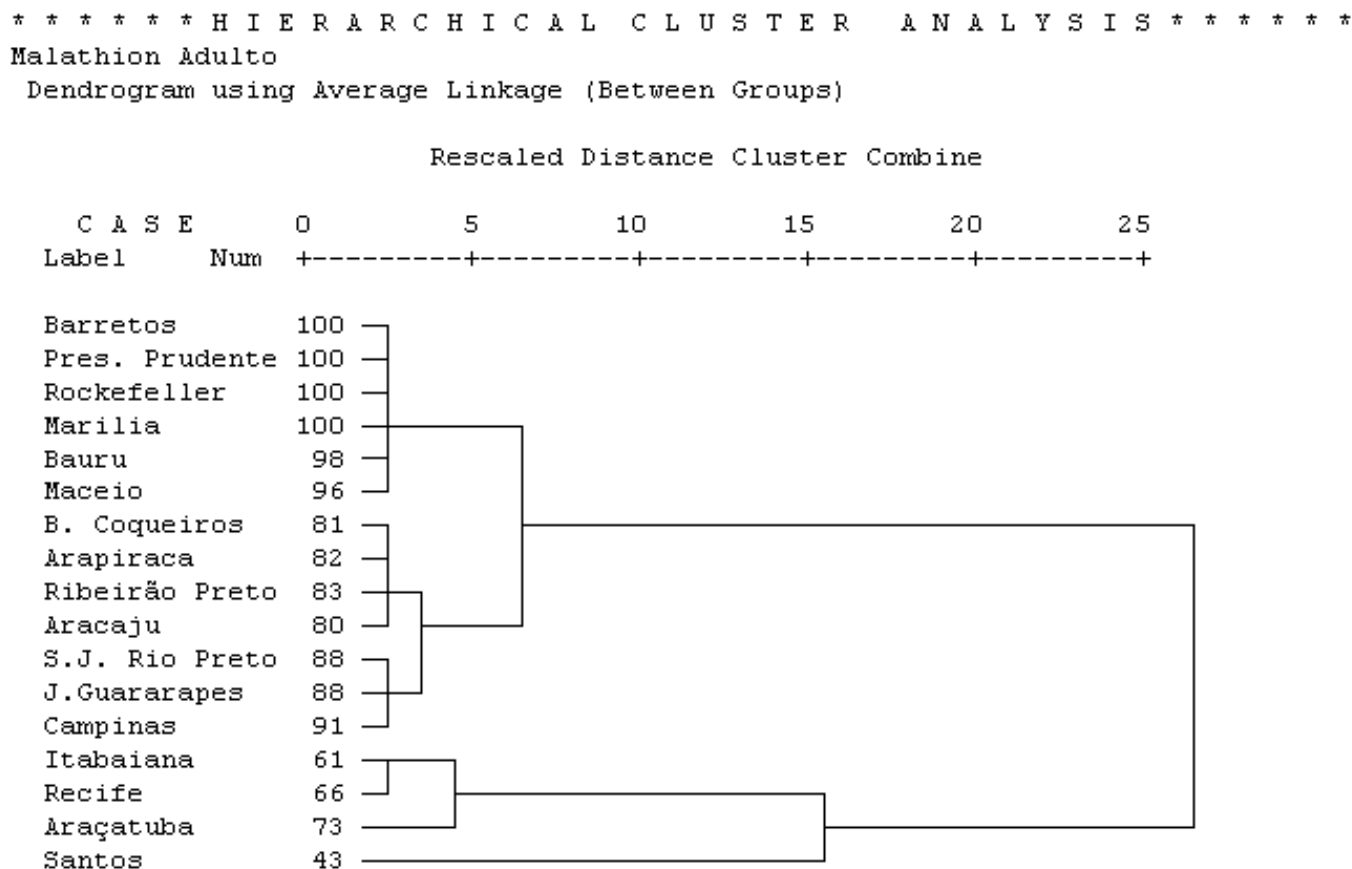
Tabela 11- Percentual médio de mortalidade segundo tipo de inseticida e local de origem dos mosquitos. Estadio testado: fêmeas adultas

Inseticida	Local de Origem		
	Nordeste	SP – Alta prevalência	SP – Baixa prevalência
Cipermetrina	86,13 a A	58,36 b A	80,80 a b A
Permetrina	88,11 a A	8,24 c B	40,40 b B
Malathion	79,11 a A	77,30 a A	97,35 a A

- (1) Percentuais seguidos de diferentes letras minúsculas (comparação nas linhas) diferem estatisticamente ($p < 0,05$).
- (2) Percentuais seguidos de diferentes letras maiúsculas (comparação nas colunas) diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

Os resultados dos bioensaios com adultos foram, também, submetidos à análise de agrupamentos. Para o adulticida do grupo dos organofosforados (malathion) os resultados estão expressos na figura 5. Podemos observar que, de modo geral, as linhagens mais suscetíveis ao malathion foram do Estado de São Paulo (agrupadas mais próximas de Rockefeller) enquanto que as linhagens do Nordeste apresentaram níveis inferiores de percentual de mortalidade. As linhagens de Araçatuba e Santos, no entanto, apresentaram a maior distância da linhagem suscetível (menor percentual de mortalidade). Nestes municípios, ao contrário dos demais municípios do Estado de São Paulo houve uso do malathion para o controle das formas adultas do vetor, conforme descrito anteriormente. A diminuição da suscetibilidade observada nos mosquitos adultos pode ser também assinalada, porém em menor grau, pela diminuição do percentual de mortalidade observado nas provas com larvas, com uso de dose diagnóstica (tabela 4) apesar de não representar um nível elevado de resistência conforme consta na tabela 9 (Razão de Resistência para malathion).

Figura 5- Dendrograma com agrupamento dos resultados dos testes com dose diagnóstica de malathion expressos em percentual de mortalidade



A análise de agrupamentos com os resultados dos bioensaios dos mosquitos adultos com inseticidas piretróides se encontra na figura 6. Com relação a este grupo, a cipermetrina foi utilizada em larga escala no Estado de São Paulo e não utilizada nos estados do Nordeste para o controle de *Aedes aegypti*. Observa-se que as linhagens de mosquitos mais próximos da linhagem suscetível Rockefeller foram provenientes do Nordeste (Barra dos Coqueiros, Maceió, Arapiraca, Aracaju e Jaboatão dos Guararapes) enquanto que as mais distantes da linhagem suscetível foram as do Estado de São Paulo (Santos, São José Rio Preto e Ribeirão Preto). Municípios estes onde se registrou a maioria dos casos de dengue o que reflete indiretamente o maior uso dos inseticidas, uma vez

que para cada caso de dengue são desencadeados as medidas de controle de adulto com uso deste produto.

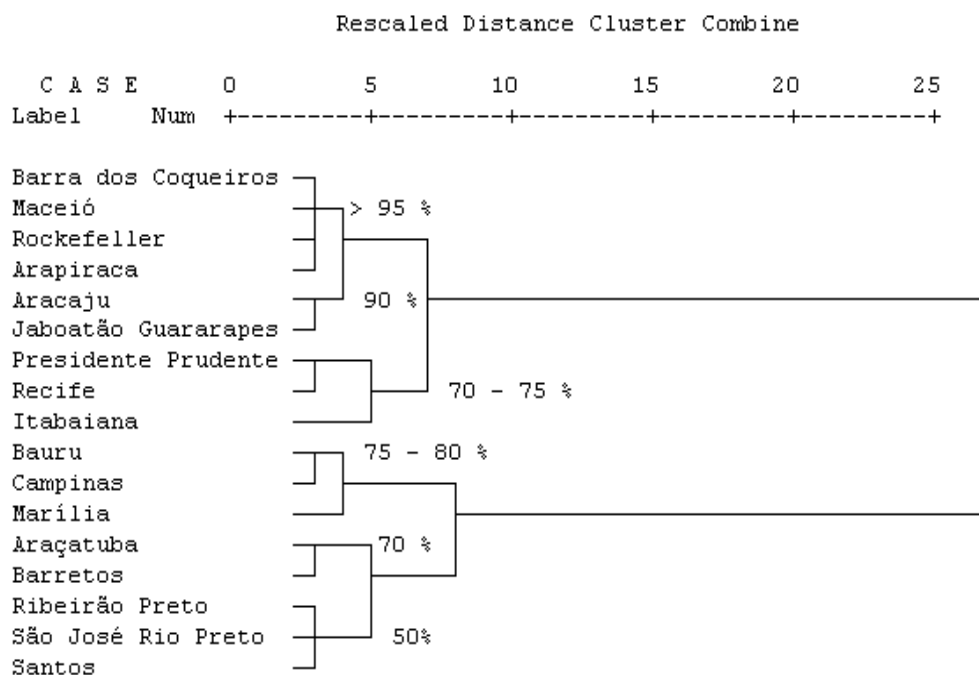
Numa situação intermediária (entre 60 a 80% de mortalidade), encontram-se as demais linhagens do Estado de São Paulo e apenas duas linhagens de mosquitos do Nordeste – Recife e Itabaiana cuja possibilidade de se tratar de resistência cruzada foi discutida anteriormente.

Figura 6- Dendrograma com agrupamento dos resultados dos testes com dose diagnóstica de cipermetrina e permetrina expressos em percentual de mortalidade

* * * * * H I E R A R C H I C A L C L U S T E R A N A L Y S I S * * * * *

PIRETRÓIDES : CIPERMETRINA E PERMETRINA

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)



5.6 Nível de suscetibilidade das linhagens de *Aedes aegypti* aos inseticidas e Prevalência de Dengue

A influência do histórico do uso de inseticidas, nos níveis de suscetibilidade das diferentes linhagens estudadas, ficou evidenciada pela diferença significativa no nível de suscetibilidade dos mosquitos adultos aos produtos da classe dos piretróides, conforme descrito na tabela 11, sendo que a menor suscetibilidade foi observada para as linhagens do Estado de São Paulo onde a cipermetrina foi utilizada durante 10 anos consecutivos.

Também foi evidenciada uma influência do uso de inseticidas do grupo dos organofosforados no nível de resistência das linhagens provenientes do Nordeste onde este grupo foi utilizado tanto para larvas como para adultos até 1999. Todas as linhagens provenientes do Nordeste apresentaram Razões de Resistência mais elevadas do que as observadas para as linhagens do Estado de São Paulo.

Ainda buscando evidenciar a influência da intensidade do uso de inseticidas no nível de suscetibilidade dos vetores, foi feito o cálculo do Coeficiente de Correlação de Pearson utilizando as variáveis: Coeficiente de Prevalência de dengue no período e os indicadores de resistência Razão de Resistência de larvas e Percentual de Mortalidade de adultos. Como já descrito anteriormente, buscou-se utilizar o Coeficiente de Prevalência de Dengue como indicador da intensidade do uso de inseticidas porque, para cada caso autóctone confirmado, são desencadeadas medidas de controle químico para bloqueio da transmissão.

Esta análise se restringiu às linhagens do Estado de São Paulo pelo fato de que neste grupo havia diferentes níveis de Coeficientes de Prevalência de Dengue e também pela segurança de que o número de casos tenha sido definido por critérios epidemiológicos mais controlados (confirmação laboratorial) do que os casos registrados na região Nordeste e também pela

certeza de que, efetivamente, haviam sido implementadas medidas de controle químico na confirmação dos casos.

Os resultados, expressos nas tabelas 12 evidenciam que há uma correlação entre Razão de Resistência das larvas e Prevalência de Dengue.

Tabela 12- Coeficiente de Correlação (Pearson) entre Prevalência acumulada de Dengue e indicadores Razão de Resistência (probabilidade)

Estadio	Indicador de resistência		
	RR Temephos	RR Fenitrothion	RR Malathion
Larvas	0,663 (0,0516)	0,915 (0,0005)	0,669 (0,0486)

RR Razão de Resistência (CL 95 linhagem teste/ CL 95 linhagem suscetível)

Houve também correlação entre Prevalência de Dengue e percentual de mortalidade dos insetos adultos, porém a correlação observada foi negativa, ou seja, há menor mortalidade aos inseticidas nas linhagens onde foi registrado maior Coeficiente de Prevalência de Dengue (tabela 13).

Tabela 13- Coeficiente de Correlação (Pearson) entre Prevalência acumulada de Dengue e Percentual de Mortalidade de adultos (probabilidade)

Estadio	Indicador de resistência – Percentual de mortalidade		
	Cipermetrina	Permetrina	Malathion
Adultos	-0,81570 (0,0074)	-0,67722 (0,0451)	-0,74808 (0,0204)

A dúvida sobre a causalidade desta correlação é de difícil solução. Podemos afirmar que há mais resistência a inseticidas nos insetos provenientes de locais onde houve maior número de casos de dengue. No entanto, é possível ter havido uma maior transmissão de dengue nos locais onde os insetos apresentaram maior resistência aos produtos utilizados com comprometimento da eficácia das atividades de controle químico. De todo modo, a existência de linhagens resistentes a inseticidas sempre é decorrência do próprio uso de produtos, mesmo que em regiões distantes do local de coleta dos insetos. Além disso, o perfil de resistência apresentado pelas linhagens, relacionado ao

tipo de produto utilizado tanto em São Paulo como no Nordeste, reforçam a hipótese de que o desenvolvimento da resistência tenha sido causado pela intensidade do uso de inseticidas. A possibilidade de haver linhagens resistentes e isto ocasionar falhas no controle parece ser mais viável de ocorrer no município de Santos, pela existência do Porto e a maior possibilidade de introdução de linhagens provenientes de outras regiões. Uma avaliação da origem das diversas linhagens, através de caracterização genética, pode contribuir para esclarecer esta dúvida.

O panorama mundial da resistência aos inseticidas utilizados para o controle das formas adultas do vetor de dengue é bastante preocupante. Primeiro porque não existem muitas alternativas de produtos disponíveis. Num levantamento realizado pela OMS, o uso global de inseticidas para o controle de dengue é realizado, principalmente, através dos produtos usados no Brasil como malathion, fenitrothion (organofosforados) e cipermetrina (piretróide) (WHO, 2002).

Em segundo lugar, o fenômeno da resistência tem sido observado em todas as regiões onde se usa controle químico. A resistência a piretróides e organofosforados já está registrada desde a Ásia (VU-DUC, 1999; TZE et al, 2001) até as Américas (WHO, 1992; RODRIGUEZ, et al, 2001).

Outro fator preocupante é a possibilidade do desenvolvimento de resistência do tipo kdr (knock-down resistance) o qual, através do bloqueio dos canais de sódio impede a ação do inseticida DDT e confere resistência cruzada aos piretróides em geral por ser este o sítio de ligação desta classe de inseticida (BROGDON & MCALLISTER, 1998). O DDT foi intensamente utilizado no controle de *Aedes aegypti* o que selecionou resistência a este produto praticamente a nível global (WHO, 1992). Para as linhagens provenientes de São Paulo, é fundamental avaliar se este é o mecanismo envolvido na resistência aos piretróides. A diminuição da disponibilidade dos inseticidas da classe dos piretróides determina a necessidade do uso de produtos mais tóxicos ao homem e ambiente como os organofosforados.

6. Conclusões

Padronização dos bioensaios:

- As doses preconizadas pela OMS são pouco discriminatórias para malathion (por serem muito baixas) e para fenitrothion e temephos (por serem elevadas).
- A padronização dos bioensaios e a estimativa de dose diagnóstica em nível local permitiram uma maior discriminação entre os resultados das diferentes linhagens testadas.
- Uma vez que a discriminação de resposta entre amostras de *Aedes aegypti* de diferentes regiões foi obtida após calibração da dose a ser utilizada, sugere-se que se proceda esta padronização antes de se adotar doses sugeridas pela OMS. Doses inadequadas podem superestimar ou subestimar a resistência, causando sérios problemas quanto à interpretação dos resultados.

Avaliação do nível de suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* aos inseticidas organofosforados utilizados para seu controle em amostras de linhagens do Estado de São Paulo, Pernambuco, Alagoas e Sergipe:

- Tanto nas provas com uso de dose diagnóstica como nas estimativas de Razão de Resistência, para os três inseticidas organofosforados testados foi observado um nível maior de resistência nas linhagens de mosquitos provenientes do Nordeste.
- No Estado de São Paulo, apenas foi observada resistência na linhagem procedente de Santos. Como naquele município foi registrado o maior coeficiente de prevalência de dengue e também é onde existe o maior porto do país, a caracterização genética desta linhagem poderá esclarecer se o nível de resistência observado foi conseqüente ao uso de controle químico ou se a linhagem foi introduzida já com níveis elevados de resistência a inseticidas.

- Mesmo considerando os níveis de resistência “baixos” se comparados aos observados em outras regiões como, por exemplo, o Caribe, é fundamental que se utilizem as informações sobre a suscetibilidade para avaliações de eficácia dos produtos em situação de campo.

Avaliação do nível de suscetibilidade de formas adultas de *Aedes aegypti* aos inseticidas organofosforados e piretróides utilizados para seu controle em amostras de linhagens do Estado de São Paulo, Pernambuco, Alagoas e Sergipe:

- Para os inseticidas do grupo dos piretróides (cipermetrina e permetrina) verificou-se que quase todas as linhagens do Estado de São Paulo apresentaram resistência a estes produtos. Já as linhagens do Nordeste apresentaram níveis de suscetibilidade mais elevados a este grupo de inseticida exceto nas linhagens de Pernambuco (Recife e Jaboatão dos Guararapes) e a de Itabaiana (SE).
- Como as linhagens de Pernambuco e também a de Itabaiana apresentaram altos níveis de resistência a temephos, a diminuição da suscetibilidade à permetrina pode ser devida ao fenômeno de resistência cruzada.
- O nível de suscetibilidade ao organofosforado malathion é bem mais elevado do que o observado para piretróides no Estado de São Paulo enquanto que no Nordeste já se observa diminuição da suscetibilidade a este grupo.
- Os resultados indicam a necessidade de se adotar medidas de manejo da resistência para piretróides em São Paulo.

Influência do histórico do uso de inseticidas na suscetibilidade do *Aedes aegypti* :

- No Estado de São Paulo, onde foram usados inseticidas organofosforados preferencialmente para o controle de larvas e piretróides em nebulizações para controle de adultos, observou-se, após dez anos de pressão de

seleção, alto nível de resistência a piretróide (adultos) e nível baixo de resistência a organofosforados (larvas).

- Nos Estados do Nordeste, onde foram utilizados inseticidas da classe dos organofosforados tanto para larvas como para adultos por um período de tempo superior, só se introduzindo o uso de cipermetrina (piretróide) em 1999, o que se observou foi um nível superior de resistência a organofosforados (larvas e adultos), porém maior suscetibilidade aos inseticidas piretróides.
- Para as linhagens de mosquitos provenientes do Estado de São Paulo foi observada correlação entre resistência aos inseticidas e prevalência de dengue.
- A estratégia de controle de dengue, através do uso de controle químico pode ter sua eficácia ameaçada pela presença de linhagens resistentes aos inseticidas utilizados no Brasil. Isto deve ser considerado para que se dê ênfase às medidas de controle integrado, com limitação do uso de inseticidas às situações de emergência.

7. Summary

dengue control has been generally based on vector control through the use of insecticides. This strategy might lose efficacy if resistance to insecticide arises and this is especially frequent when insecticides are used for a long time.

The World Health Organization proposed standard methods for evaluation resistance to pesticides in insects recognizing the impact of resistance on the failure of vector control activities. While assessing resistance status on a vector population, one should consider the history of insecticide that this strain has been exposed to, as this represents the pressure to resistance selection. In Brazil, there was a difference on the choice of insecticides that were used against the adult stage of *Aedes aegypti*. While in the State of São Paulo the pyrethroid cypermethrin has been used since 1989, in the other states this insecticide has been introduced only in 1999. Before that, adult control was done with insecticides of organophosphorus group (malathion and fenitrothion). For immature stage of the vector there was no difference on insecticide choice and the another organophosphorus product (temephos) have been used since the 80's.

The objective of this study was to evaluate the influence of insecticide use on the status of susceptibility of different strains of *Aedes aegypti*. Bioassays indicated that resistance levels to organophosphorus in larvae were higher in strains from the Northeast Region where this class of pesticide was the choice for both immature and adult stages of the vector. The bioassays with the adult stage indicated important resistance to pyrethroids in the strains from the State of São Paulo probably due to the continuous use of the same product during 10 years. By the other hand the level of susceptibility to pyrethroids in the strains from Northeast region was higher. Besides the influence of use of insecticides on resistance status of the vector, the standardization of bioassays methods and the influence of intensity of insecticide use on resistance levels were assessed.

8. Referências Bibliográficas:

ANDRADE, C.F.S., MODOLO, M. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to Temephos and *Bacillus thuringiensis var israelensis* in integrated control. **Rev. Saúde Pública**, v25 (3), p.184-187, 1991.

BROGDON, W.G., MCALLISTER, J. Insecticide Resistance and Vector Control. **Emerg. Infect. Dis.**, v4(4) p.605-613, 1998.

BROWN, A.W.A. Insecticide Resistance in mosquitoes. A pragmatic review. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v2, p.123 – 140, 1986.

CAMPOS, J., ANDRADE, C.F.S. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. **Rev. Saúde Pública**, v35 (3), p.232 – 236, 2001.

CANYON, D.V., HILL, J.L.K. Insecticide susceptibility status of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Townsville. **Australian Journal of Entomol.**, v38 (1) p.40 – 43, 1999.

CENTER OF DISEASE CONTROL – CDC. **Biologia y control del Aedes aegypti**. Vector Topics. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, Georgia, 1980.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para *publicações da UNESP**. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas. BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – CVE. Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo. Dengue. [online, acesso em 16/08/2002]. Disponível em http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/Cve_deng.htm

DINARDO MIRANDA L.L. **Variabilidade proteica em populações naturais de *Aedes aegypti*** (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). Ribeirão Preto; 1994.p 120. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

FAY, R.W., ELIASON, D.A. A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti* . **Mosq. News**, v26, p.531–535, 1966.

FERRARI, J.A. Insecticide resistance. In: Marquardt, William C., Beaty, Barry J. **The Biology of Disease Vectors**. University Press of Colorado, 1996. Cap. 30, p.512-529.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE – Funasa, Seminário Internacional de Controle de Vetores e Reservatórios. **Reunião de Grupo Técnico para Monitoramento da Resistência de vetores a inseticidas**. Ministério da Saúde. Belo Horizonte, Outubro de 1998 (ata mimeografada, 5p).

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE – Funasa, **Reunião Técnica para discussão do status de resistência de *Aedes aegypti* e definir estratégias a serem implantadas para monitoramento da resistência no Brasil**. Ministério da Saúde. Brasília, 1999 (Relatório final mimeografado, 30).

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - Funasa. **Dengue. Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor.** Ministério da Saúde, abril 2001. (Manual de Normas Técnicas, 43).

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE – Funasa. Ministério da Saúde. **Situação das doenças.** [online, acesso em 20/07/2002]. Disponível em http://www.funasa.gov.br/guia_epi/imagens/graficos_giaweb/situacao_doencas.pdf. (a).

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - Funasa. **Programa Nacional de Controle da Dengue.** Ministério da Saúde. Brasília, 2002 (Manual técnico, 34) (b).

GADELHA, D.P., TODA. A.T. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. **Rev. Bras. Malar.**, v37, p.29-36, 1985.

GEORGHIOU GP, WIRTH M, SAUME F, KNUDSEN AB. Potencial for Organophosphate Resistance in *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) in the Caribbean Area and Neighboring Countries. **J. Med. Entomol.**, v24, p.290 - 294, 1987.

GLASSER CM, GOMES AC. Infestação do Estado de São Paulo por *Aedes aegypti* e por *Aedes albopictus*. **Rev Saúde Públ.**, v.34, p.570-7, 2001.

GÓMEZ-DÁNTES, H. El dengue en las Americas. Um problema de Salud Regional. **Salud Pública de México**, v33 (4) p.347-355, 1991.

GUBLER, D.J., TRENT, D.W. Emergence of Dengue/Dengue Hemorrhagic fever as a Public Health Problem in the Americas. **Infections agents and disease**, v2 (6) p.383 - 393, 1993.

JAKOB, W.L., BEVIER, G.A. Application of ovitraps in the U.S. *Aedes aegypti* eradication program. **Mosquito News**, v29 (1) p.55 - 61, 1969.

LeOra Software. Polo-PC :Probit Or LOGit analysis [programa de computador]. Berkeley (Calif);1987.

MACORIS, M.L.;CAMARGO, M.F.;SILVA, I.G.;TAKAKU, L, ANDRIGHETTI, M.T.M. Modificação da suscetibilidade de *Aedes aegypti* ao Temephos. **Rev. Patol. Trop.**, v24 (1) p.31-40. 1995.

MACORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M.T.M.; TAKAKU, L., GLASSER, C.M., GARBELOTTO, V.C., CIRINO, V.C.B.. Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ.**, v33 (5) p.521 – 522, 1999.

MARZORCHI, K.B.F. Dengue in Brazil – Situation, Transmission and Control – A proposal for Ecological control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 89 (2), p. 235-245, 1994.

MAZZARRI, M.B., GEORGHIOU, G.P. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. **J. Am. Mosquito Control Ass.**, v11 (3), p.315 – 322, 1995.

Ministério da Saúde. Dengue no Brasil. Relatório apresentado no Congresso Internacional de Medicina Tropical, Havana, Cuba, dezembro de 1988.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. **Resistencia a los insecticidas y lucha contra los vectores.** Décimo informe del Comité de Expertos en Insecticidas. Ginebra, 1960 (Serie de Informes Técnicos, 191).

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. **Controle das doenças tranmissíveis no homem.** Washington, PAHO, 1983. (Cuaderno técnico, 70).

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. **El dengue in las Americas – 1980 – 1987.** PAHO, 1989.(Bol. Epidemiologico, 10).

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia teoria e prática.** Guanabara Koogan:Rio de Janeiro, 2000.596.

RAWLINS, S. C., RAGOONANSINGH, R. Comparative organophosphorus insecticide susceptibility in Caribbean Populations of *Aedes aegypti* and *Toxorhynchites moctezuma*. **J. Am. Mosquito Control Ass.**, v6 (2),p.315 - 317, 1990.

RAWLINS, S.C., WAN, J.O. Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides. **J. Am. Mosquito Control Ass.**, v11 (1) p.59 – 65, 1995.

RAWLINS, S.C. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. **Rev. Panamena de Salud Publica**, v.4 (4) p.243-251, 1998.

RODRIGUEZ, M.M.; BISSET, J.; FERNANDEZ, D.M.; LAUZAN, L., SOCA, A. Detection of Insecticide Resistance in *Aedes aegypti*

(Díptera: Culicidae) from Cuba and Venezuela **J. Med. Entomol.**, v.38(5), p.623 – 628, 2001.

ROUSH, R. T., MILLER, G.L. Considerations for Design of Insecticide Resistance Monitoring Programs. **J. Econom. Entomol.**, v79 (2) p.293 - 298, 1986.

SPARKS, T.C., LOCKWOOD, J.A., BYFORD, R.L., GRAVES, J.B., LEONARD, B.R. The role of behavior in insecticide resistance. *Pestic. Sci.* v.26, p.383-399.

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS – Sucen. **Programa de Controle dos Vetores de Dengue e Febre Amarela.** Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, 1992 (mimeo, 52).

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS – Sucen. Guia de Instruções. **Plano de Erradicação de *Aedes aegypti*.** Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, 1998 (mimeo, 59).

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS – Sucen. **Monitoramento da suscetibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas utilizados para seu controle no Estado de São Paulo.** Resultados dos testes realizados em 2000 pelo Núcleo de Pesquisa do Serviço Regional 11 – Marília. Marília, Junho 2000 (Relatório mimeografado, 9).

SOUZA, M.S.L. **Guia para redação e apresentação de teses.** COOPMED: Belo Horizonte, 1997.113p.

TABASHNICK, B.E.; CUSHING, N.L.; JOHNSON, M.W. Diamondback moth (Lepdoptera:Plutellidae) resistance to insecticides in Hawaii: Intra - Island variation and cross resistance. *Fórum. J. Econom. Entomol.*,v80 (2) p.1091-1099, 1987.

TABASHNIK, B.E. Managing Resistance with Multiple Pesticide Tactics: Theory, Evidence and Recommendations. *J. Econom. Entomol.*, v82 (5), p.1263 – 1269, 1989.

TZE, P.L., ROSINAH, Y, SAI, G.L>P. Susceptibility of adult field strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Singapore to pirimiphos-methyl and permethrin. *J. Am. Mosquito Control Ass*, v17(2) p.144 - 146, 2001.

VU-DUC, H., NGUYEN, T.B.N. Susceptibility of *Aedes aegypti* to insecticides in South Vietnam. *Dengue Bulletin*, v23, p.85-88, 1999.

WIRTH, M.C., GEORGHIOU, G. P. Selection and characterization of Temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, Virgin Islands. *J. Am. Mosquito Control Ass.*, v15 (3) p.315 - 320, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Criteria and Meaning of Tests for Determining the susceptibility or Resistance of Insects to insecticides.** Geneva,1981 (a).Offset (WHO/VBC 81.6).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Instructions for determining the suscetibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides - Diagnostic test.** Geneva, 1981(b Offset (WHO/VBC/81.806).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides. Establishment of the baseline.** Geneva, 1981 (c).Offset (WHO/VBC/81.805).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides.** Geneva; 1981 (d).Offset (WHO/VBC/ 81.807).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Vector resistance to pesticides.** Geneva;1992. (Technical Report Series, 818).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **A collaborative study to assess the stability of alcoholic Temephos solutions used for resistance monitoring in *Aedes aegypti*** Geneva, 2000. (mimeo, 4).

World Health Organization. **Global Insecticide use for Vector-Borne Disease Control.** Geneva, 2002. (Scientific Publication, GCDPP/2002.2).