

JONNY EDWARD DUQUE LUNA

DESCRIÇÃO E ANÁLISE DE FATORES EPIDEMIOLÓGICOS, VETORIAIS E DO
CONTROLE DA DENGUE NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor, pelo curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área Entomologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva

Curitiba

2008

JONNY EDWARD DUQUE LUNA

"Descrição e análise de fatores epidemiológicos, vetoriais e do controle da dengue no Estado do Paraná, Brasil"

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de "Doutor em Ciências", no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Mário Antonio Navarro da Silva (Orientador)
(UFPR)



Profa. Dra. Denise Valle
(FIOCRUZ/RJ)



Prof. Dr. Almério Castro Gomes
(FSP/USP)



Profa. Dra. Sonia Maria Noemberg Lazzari
(UFPR)



Prof. Dr. Luiz Amilton Foester
(UFPR)

Curitiba, 11 de fevereiro de 2008.

Dedico este trabajo a el Dios que siempre me guió, a mi compañera Carolina, a Juan Miguel mi hijo, a mis padres Miguel y Fanny, mis hermanos Julieth, Milena, Henry, Donaliver y todo el resto de mi familia. Sin su apoyo y cariño nada de esto hubiera sido posible.

AGRADECIMENTOS

A meu Deus, por ter me dado tudo o que tenho e por nunca ter me desamparado, mesmo nos momentos mais difíceis da vida.

À minha família Carolina e Juan, esposa e filho, pela alegria diária e motivação, e também pais e irmãos na carne e fé, pelo exemplo de vida.

Ao professor Dr. Mário Antônio Navarro da Silva, por aceitar orientar-me nesta tese, pela confiança e disposição para o desenvolvimento do trabalho, pelos conselhos sempre acertados, não só da tese, como também de outros aspectos da vida. Essa amizade, respeito e exemplo expressado ao longo de seis anos foram muito valiosos para motivar e estruturar a finalização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo.

Aos colegas de Laboratório de entomologia Médica, Eduardo, Ana Tissot, Josiane, Lisiane, Ana Dalla, Elaine, Allan e Milena, pela amizade.

Aos amigos da colônia hispânica, Daniel, Pepe, Gregório, Paul, Felipe, Héctor, Eduardo, Angela, Leslie e Jaime. Aos amigos de curso, tertúlia e futebol, Eduardo Kuwabara, Wesley, Marcel, Edílson, Rogério, Antonio, Jaime, Gustavo, Paschoal, Claudivã, Nuno, Fernando, Edílson, Tiago, Everton, Erico, Triba, Eduardo “borboleta”, Marion, Kelli, Olívia, Elaine, Alexandre, Jonas, Rodolfo. Mesmo, em outras atividades diferentes às acadêmicas, como, churrascos, jogando bola, ou simplesmente tomando café, foi muito o que aprendi com cada um de vocês.

Ao colega e amigo Felipe Vivallo pela leitura crítica da tese.

Ao colega Ricardo Vieira da Silva, que tive o prazer de co-orientar em sua monografia e que é parte dos resultados do primeiro capítulo da tese.

À colega Elaine Cristina da Silva Fantinatti, a quem tive o prazer de co-orientar em sua monografia e que me auxiliou permanentemente nos experimentos da tese.

Aos funcionários da Secretaria do Estado da Saúde do Paraná, especialmente ao coordenador da parte de entomologia Allan Martins, pelo interesse e colaboração permanente relacionada ao envio do material para os testes biológicos.

À pesquisadora Maria de Lourdes da Graça Macoris da Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN- Marília (SP), por me permitir observar o modelo de criação do material para os bioensaios, como também as metodologias padronizadas destes.

Aos Dr(s), Denise Valle e José Bento Pereira Lima, do Instituto de Biologia do Exército Instituto Oswaldo Cruz (RJ) pela amabilidade, esclarecimento das dúvidas apresentadas no percurso deste trabalho e pelo fornecimento do inseticida temefós.

Finalmente ao Brasil, à sua gente, pela oportunidade que me deram.

RESUMO

Descrição e análise de fatores epidemiológicos, vetoriais e do controle da dengue no Estado do Paraná, Brasil. Esta tese foi realizada em decorrência do aumento dos casos da dengue observados na última década e a necessidade de entender este fenômeno para determinar estratégias viáveis de controle do vetor *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762. Compreende, inicialmente, um estudo dos casos da dengue no período de 1995 até 2007, analisando a relação entre as localidades com número de casos e com aspectos que comprometem o controle do mosquito, como a perda de susceptibilidade aos principais inseticidas utilizados para seu controle populacional, no estado do Paraná, Brasil. Observa-se que a dispersão dos casos da dengue apresenta relação com as áreas de fronteira nacional e internacional. No final, questões são levantadas sobre a necessidade de fortalecer as estratégias de vigilância entomológica, como a importância das ações de controle do vetor no estado adulto e manter as densidades do vetor próximas a zero. Para responder estas, questões estabeleceram-se quatro objetivos gerais que correspondem, seqüencialmente, a cada capítulo da tese, da seguinte forma: Capítulo I. Revisar os últimos registros relativos à transmissão de dengue no Estado do Paraná, incluindo uma análise da ocorrência e dispersão dos casos da dengue no Estado entre 1995 e 2007, avaliando a relação destes casos entre áreas de fronteira nacional e internacional; Capítulo II. Determinar se há um perfil de susceptibilidade ao temefós no estado e determinar através da atividade de oviposição na estação de inverno se há diminuição nos índices de infestação de *Aedes* spp. que possam ser relacionados com o status de susceptibilidade resultante; Capítulo III. Monitorar, com armadilhas de oviposição vetorial, se ocorrem ovos de *A. aegypti* ou *A. albopictus*, como também obter informação ecológica para fazer inferências sobre a presença concomitante destas espécies e sua implicação para vigilância entomológica; e Capítulo IV. Simular a integração de métodos de controle de *A. aegypti* incluindo resistência a inseticidas e sua resposta na transmissão da dengue. Observou-se que a ocorrência da dengue no estado do Paraná está principalmente concentrada nas regiões noroeste, oeste, centro-ocidental, norte-central e norte pioneiro com 99,98% dos casos autóctones. Foram consideradas como resistentes as populações de *A. aegypti* de Foz do Iguaçu, Paranaíba, Maringá, Ibiporã, Jacarezinho e Cambé com alterações incipientes da susceptibilidade, sendo que, durante o inverno, há redução da pressão de controle que não incrementa a susceptibilidade da população. Os resultados acusam a presença de *A. aegypti* e *A. albopictus* nos municípios de Maringá, Cambé, Jacarezinho e Paranaíba. *A. albopictus* não foi detectado em Ibiporã, porém onde esteve presente foi menos abundante. A proporção entre sexos de *A. aegypti* aproximou-se de 1:1, diferentemente de *A. albopictus*. Na comparação entre adultos das duas espécies detectou-se uma correlação negativa nas amostras de Maringá e Cambé, podendo ser atribuída a sazonalidade dessas populações. Simulações confirmaram que aplicações de inseticidas devem ser combinadas nos estágios larval e adulto do vetor para reduzir rapidamente a epidemia. Também se observou que para não comprometer o controle do mosquito, é necessário que os inseticidas sejam altamente efetivos, que as aplicações tenham alta cobertura e que estejam sempre acompanhados da remoção de criadouros permanentes. Conclui-se que a dengue no Estado é um fenômeno que deve ocorrer com maior intensidade após cada onda epidêmica e que as estratégias atuais de controle do vetor podem estar falhando na cobertura de controle que se agrava relativamente com a perda de eficiência dos inseticidas.

Palavras-chave. Epidemiologia, dengue, distribuição espacial da dengue, resistência química e vigilância entomológica, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, Modelo matemático de transmissão da dengue.

ABSTRACT

Description and analysis of epidemiological factors, vectors and dengue control in the state of Paraná, Brazil. This thesis was carried out due to the increase of cases of dengue registered in the last decade and the urge to understand this phenomenon in order to implement suitable strategies to control the vector *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762. At first, it involves the study of dengue cases from 1995 to 2007, analyzing the relationship of localities with higher number of cases with certain factors that may compromise the mosquito control, such as the loss of susceptibility to insecticides used for its population control in the State of Paraná, Brazil. It is observed that the dispersion of dengue cases is related to national and international border areas. In the end, questions are raised concerning the necessity to improve the strategies for entomological control, as well as the importance of controlling the vector in adult stage and keeping its densities close to zero. In order to fulfill these inquiries, four general objectives were established and they sequentially correspond to each chapter of the present thesis, in the following manner: Chapter I. To revise the most recent records related to the transmission of dengue in the State of Paraná, including an analysis of occurrence and dispersion of dengue cases in Paraná between 1995 and 2007, and assess the relationship of such cases between areas of national and international border; Chapter II. To determine if there is a susceptibility pattern to temephos in the State and, by means of oviposition activity in winter, if a reduction in the degrees of *Aedes* spp. infestation is observed, which might be related to the status of resultant susceptibility; Chapter III. To determine through ovitraps for egg sampling whether eggs of *A. aegypti* and *A. albopictus* occur concomitantly, as well as to obtain ecological data, from which inferences concerning these two species could be made and their implications for entomological monitoring; Chapter IV: to simulate the integration of methods for the control of *A. aegypti*, including resistance to insecticides and its response to dengue's transmission. The results follow respectively; Chapter I. The occurrence of dengue in Paraná is predominant in the Northwest, West, Mid-west, Mid-north and the so-called "Pioneer North" regions with 99,98% of the autochthonous cases. Chapter II. The populations of *A. aegypti* considered resistant are those found in Foz do Iguaçu, Paranavaí, Maringá, Ibiporã, Jacarezinho and Cambé with incipient alterations in susceptibility, considering that during winter there is a reduction on the control pressure that does not augment the population's susceptibility. Chapter III. The results pointed out the presence of *A. aegypti* and *A. albopictus* in the municipalities of Maringá, Cambé, Jacarezinho and Paranavaí. *A. albopictus* was not detected in Ibiporã, even though it was less abundant where present. The proportion between sexes of *A. aegypti* was close to 1:1, differently from *A. albopictus*. Between adults of the two species a negative correlation in the samples of Maringá and Cambé was detected, which could be attributed to the seasonality of these populations. Chapter IV. Simulations had confirmed that applications of insecticides must be directed to both larval and adult stages of the vector in order to quickly diminish the epidemic. It was also observed that, should the mosquito control not be compromised, it would be necessary that insecticides ought to be highly effective, that their application has great effectivity and that it is always followed by continuous removal of breeding sites. It is concluded that dengue in Paraná is a phenomenon that must occur subsequent to each epidemic wave and that the current strategies for vector control may be failing in the control covering, which is relatively aggravated with the loss of the insecticide efficiency.

Key words. Epidemiology, dengue, space distribution of dengue, chemical resistance and entomological monitoring, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, mathematical model of dengue transmission.

LISTA DE FIGURAS

		Pág
INTRODUÇÃO GERAL		
Figura 1 -	Incidência da dengue nos Estados de maior risco no Brasil em 2007 (tomado da Secretaria de vigilância em Saúde de Ministério da Saúde (SVSMS)).....	18
CAPITULO I		
Figura 1 -	Incidência da dengue no Brasil e no Estado do Paraná entre o período de 1995 a 2007. Os dados de 2007 são apenas do período janeiro a julho (Adaptado da Secretaria de Vigilância em Saúde de Ministério da Saúde (SVSMS)).....	44
Figura 2 -	Número de casos autóctones e importados, número de municípios com registro de casos autóctones e importados da dengue no Estado do Paraná no período de 1995 a 2005 (Adaptado dos dados da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA/PR)).....	45
Figura3 -	a) Distribuição do total de casos da dengue no Estado do Paraná entre 1995 e 2005; b) Os dez municípios com maior incidência da dengue no Estado do Paraná, entre 1995 e 2005 (Adaptado dos dados da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA/PR)).....	46
Figura 4 -	Distância de correlação da dengue nas áreas de fronteira do Paraná, entre o período de 1995 a 2007 (Adaptado dos dados da Secretaria de Vigilância em Saúde de Ministério da Saúde (SVSMS) e da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS))....	49
Figura 5 -	Principais rodovias e casos da dengue no Estado do Paraná, Brasil entre o período 1995 a 2005 (Adaptado dos dados da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA/PR)).....	51
Figura 6 -	a) Municípios infestados pelo <i>Aedes aegypti</i> por cinco anos ou mais (em escuro), no período de 1995 a 2005 (SESA/PR); b) Classificação climática do Estado do Paraná, segundo Köppen, onde Cfa- clima subtropical, com verões quentes e com chuvas abundantes; e Cfb - clima temperado, com verões mais frescos (Adaptado de IAPAR 2000); c) Distribuição dos casos autóctones e importados por área.....	54
Figura 7-	Dispersão dos casos autóctones da dengue no Estado do Paraná, Brasil, período de 1995 – 1997 (Adaptado dos dados da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA/PR)).....	55
Figura 8-	Dispersão dos casos autóctones da dengue no Estado do Paraná, Brasil, período de 1999- 2000 (Adaptado dos dados da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA/PR)).....	56
Figura 9 -	Dispersão dos casos autóctones da dengue no Estado do Paraná, Brasil, período de 2001- 2003 (Adaptado dos dados da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA/PR)).....	57
Figura 10 -	Dispersão dos casos autóctones da dengue no Estado do Paraná, Brasil, período de 2004-2005 (Adaptado dos dados da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA/PR)).....	58

CAPITULO II

Figura 1 -	a) Equipe da Secretaria do Estado da Saúde do Paraná, b) Preparação das armadilhas de oviposição e c) Armadilha instalada. Foto tirada em 24/1/2005 na Rodoferroviária, Curitiba PR.....	75
Figura 2 -	Mapa do Estado do Paraná, destacando os municípios onde foram instaladas as armadilhas de oviposição para coleta de ovos de <i>Aedes aegypti</i>	76
Figura 3 -	Etapas da preparação dos testes de susceptibilidade em laboratório de populações de <i>Aedes aegypti</i> de dos municípios amostrados do Estado do Paraná.....	79
Figura 4 -	Modelo para elaboração dos testes de susceptibilidade ao inseticida temefós (modelo sugerido para preparar as diluições do inseticida, anexo 1).....	80
Figura 5 -	Número de paletas positivas para <i>Aedes</i> spp. e total de ovos nas armadilhas de oviposição de Maringá (a) e Jacarezinho (b) no período de abril de 2005 a março 2006. Em Jacarezinho não foram instaladas armadilhas em novembro por problemas operacionais.....	83

CAPITULO III

Figura 1 -	Municípios paranaenses onde foram instaladas as armadilhas de oviposição.....	101
Figura 2 -	a) Instalação das armadilhas de oviposição, b) Armazenamento e c) Indução a eclosão e separação de indivíduos para determinar a abundância e coexistência de <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i> em municípios do Paraná.....	105

CAPITULO IV

Figura 1 -	Fluxograma da dinâmica de transmissão da dengue.....	125
Figura 2 -	Cenário para transmissão da dengue na ausência da dengue, aplicação de 0% de controle nos estágios larval e adulto do vetor. Hospedeiros infecciosos <i>Ih</i> e Vetor infeccioso <i>Iv</i>	132
Figura 3 -	Cenário para transmissão da dengue simulando aplicação de 0% de controle nos estágios larval e adulto. Hospedeiros infecciosos <i>Ih</i> e Vetor infeccioso <i>Iv</i>	132
Figura 4 -	Cenário para transmissão da dengue simulando aplicação de 100% de controle nos estágios larval e adulto. Hospedeiros infecciosos <i>Ih</i> e Vetor infeccioso <i>Iv</i>	133
Figura 5 -	Cenário para transmissão da dengue simulando aplicação de 100% de controle nos estágios adulto e larval 0%. Hospedeiros infecciosos <i>Ih</i> e Vetor infeccioso <i>Iv</i>	133
Figura 6 -	Cenário para transmissão da dengue simulando aplicação de 0% de controle nos estágios adulto e larval 100%. Hospedeiros infecciosos <i>Ih</i> e Vetor infeccioso <i>Iv</i>	134
Figura 7 -	Cenário para transmissão da dengue simulando aplicação de 100% de controle no estágios adulto e considerando uma perda de efetividade do inseticida larvário de 30%. Hospedeiros infecciosos <i>Ih</i> e Vetor infeccioso <i>Iv</i>	134
Figura 8 -	Cenário para transmissão da dengue simulando perda de efetividade de 20% de controle no estágio adulto e considerando uma perda de efetividade do inseticida larvário de 30%. Hospedeiros infecciosos <i>Ih</i> e Vetor infeccioso <i>Iv</i>	135

Figura 9 - Cenário para transmissão da dengue simulando perda de efetividade de 50% de controle no estágio adulto e considerando uma perda de efetividade do inseticida larvário de 30%. Hospedeiros infecciosos I_h e Vetor infeccioso I_v	135
Figura 10 - Cenário para transmissão da dengue simulando perda de efetividade de 20% de controle no estágio adultos e considerando uma perda de efetividade do inseticida larvário de 30%. Com uma população inicial de 5000 vetores. Hospedeiros infecciosos I_h e Vetor infeccioso I_v	136
Figura 11- - Cenário para transmissão da dengue simulando perda de efetividade de 20% de controle no estágio adulto e considerando uma perda de efetividade do inseticida larvário de 30%. Com uma população inicial de 2000 vetores. Hospedeiros infecciosos I_h e Vetor infeccioso I_v	136
Figura 12 - Cenário para transmissão da dengue simulando perda de efetividade de 10% de controle no estágio adulto e considerando uma perda de efetividade do inseticida larvário de 10%. Com uma população inicial de 2000 vetores. Hospedeiros infecciosos I_h e Vetor infeccioso I_v	137
Figura 13 - Cenário para transmissão da dengue simulando perda de efetividade de 65% de controle no estágio adulto e considerando uma perda de efetividade do inseticida larvário de 30%. Com uma população inicial de 1500 vetores. Hospedeiros infecciosos I_h e Vetor infeccioso I_v	137
Figura 14 - Cenário para transmissão da dengue simulando perda de efetividade de 65% de controle no estágio adulto e considerando uma perda de efetividade do inseticida larvário de 30%. Com uma população inicial de 15000 vetores. Hospedeiros infecciosos I_h e Vetor infeccioso I_v	138

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela I -	Fatores que influenciam surgimento da resistência a inseticidas (Georghiou & Taylor 1986).....	24
------------	------------------------------------------------------------------------------------------------	----

CAPITULO I

Tabela I -	Total de casos da dengue no período 1995 a 2007 no Brasil e no Estado do Paraná (Adaptado da Secretaria de Vigilância em Saúde de Ministério da Saúde (SVSMS)).....	42
Tabela II -	As três cidades com maior número de casos da dengue no Estado do Paraná, no período de 1995 a 2007 (Adaptado da Secretaria de Vigilância em Saúde de Ministério da Saúde (SVSMS)).....	49
Tabela III -	As dez cidades com maior incidência de casos de dengue no Estado do Paraná, no período de 1995 a 2005 (Adaptado dos dados da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA/PR)).....	50
Tabela IV -	Incidência da dengue por cada 10000 habitantes nos Estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná e nos países do Paraguai e da Argentina entre o período de 1995 a 2007 (Adaptado da Secretaria de Vigilância em Saúde de Ministério da Saúde (SVSMS)).....	52

CAPITULO II

Tabela I -	Localidades e períodos de instalação das armadilhas de oviposição para <i>Aedes aegypti</i>	74
Tabela II -	Número de ovitrampas, Índice de oviposição (I.P.O) e espécies nos municípios do Estado do Paraná.....	84
Tabela III -	Atividade de oviposição sazonal de <i>Aedes</i> spp. nos municípios de Maringá e Jacarezinho no período de abril de 2005 a março 2006.....	86
Tabela IV -	Avaliação da mortalidade com as concentrações diagnósticas 0.0060 mg/L (calibrada com a cepa Rockefeller MC) e 0.0120 mg/L (recomenda OMS) nas populações de <i>Aedes aegypti</i> em sete municípios do Estado do Paraná em comparação com a linhagem susceptível Rockefeller.....	86
Tabela V -	Geração utilizada nos testes (F), concentrações letais (mg/L), coeficiente angular e razão de resistência de <i>Aedes aegypti</i> nos municípios do Estado de Paraná.....	87

CAPITULO III

Tabela I -	Situação da infestação dos municípios de Jacarezinho, Maringá, Paranavaí, Cambé e Ibiporã - 2005-2006, segundo Índice Predial (percentuais anuais) obtido do SISFAD - SESA/PR.....	102
Tabela II -	Positividade das palhetas e coexistência de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> nos municípios de Jacarezinho, Maringá, Paranavaí, Cambé e Ibiporã.....	106
Tabela III -	Atividade ovipositora, eclosão e sexagem de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i> nos municípios de Jacarezinho, Maringá, Paranavaí, Cambé e Ibiporã.....	107

CAPITULO IV

Tabela I -	Variáveis do modelo de transmissão da dengue.....	126
Tabela II -	Parâmetros do modelo de transmissão da dengue.....	127

SUMÁRIO

	AGRADECIMENTOS.....	iv
	RESUMO.....	vi
	ABSTRACT.....	vii
	LISTA DE FIGURAS.....	viii
	LISTA DE TABELAS.....	xi
1.	INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1.	A dengue.....	15
1.1.2.	A dengue no Brasil.....	16
1.1.3.	A dengue no Estado do Paraná e região Sul.....	16
1.1.4.	Prevenção e controle da dengue	16
1.2.	Os vetores da dengue.....	19
1.2.1.	Principais métodos de controle do <i>Aedes aegypti</i>	19
1.2.2.	Métodos de avaliação da perda de susceptibilidade do <i>Aedes aegypti</i> ao temefós.....	20
1.3.	Resistência a inseticidas.....	22
1.3.1.	Definição.....	22
1.3.2.	Mecanismos que conferem a resistência.....	23
1.3.3.	Resistência como uma característica inerente da evolução.....	23
1.3.4.	Fatores que contribuem com a seleção de resistência a inseticidas.....	24
1.4.	O problema da dengue no estado do Paraná.....	26
1.5.	Objetivos destinados para responder às hipóteses.....	28
1.6.	Referências bibliográficas	31
2.	CAPITULO I	35
	Estudo epidemiológico da dengue no Estado do Paraná: relação com as áreas de fronteira nacional e internacional período 1995-2007	
2.1.	Abstract.....	36
2.2.	Resumo.....	37
2.3.	Introdução.....	38
2.4.	Material e Métodos.....	39
2.5.	Resultados.....	40
2.6.	Discussão.....	59
2.7.	Conclusões.....	63
2.8.	Referências Bibliográficas.....	64
3.	CAPITULO II	67
	Avaliação da resistência das populações de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> Linnaeus, 1762 (Diptera : Culicidae) ao inseticida organofosforado temefós e dinâmica de oviposição de <i>Aedes</i> spp. nas diferentes estações do ano, no Estado do Paraná, Brasil	
3.1.	Abstract.....	68
3.2.	Resumo.....	69
3.3.	Introdução.....	70
3.4.	Material e Métodos.....	72
3.5.	Resultados.....	82

3.6.	Discussão.....	88
3.7.	Conclusões.....	91
3.8.	Referências Bibliográficas.....	92
4.	CAPITULO III	96
	Abundância e agregação de ovos de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> Linnaeus e <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> Skuse (Diptera: Culicidae) em municípios da região Norte e Noroeste do Estado do Paraná, Brasil	
4.1.	Abstrac.....	97
4.2.	Resumo.....	98
4.3.	Introdução.....	99
4.4.	Material e Métodos.....	100
4.5.	Resultados.....	106
4.6.	Discussão.....	109
4.7.	Conclusões.....	111
4.8.	Referências Bibliográficas.....	113
5.	CAPITULO IV	117
	Modelo de transmissão da dengue: tratamento integrado do vetor <i>Aedes aegypti</i> considerando resistência química a inseticidas	
5.1.	Abstrac.....	118
5.2.	Resumo.....	119
5.3.	Introdução.....	120
5.4.	Material e Métodos.....	123
5.5.	Resultados.....	129
5.6.	Discussão.....	138
5.7.	Conclusões.....	140
5.8.	Referências Bibliográficas.....	141
6.	CONCLUSÃO GERAL DA TESE	145
7.	Anexo.....	146

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A dengue

O agente etiológico que ocasiona a dengue é um arbovírus com quatro sorotipos conhecidos como DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. Taxonomicamente pertence à família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*. A infecção é adquirida através da inoculação do vírus ao homem pela picada de um mosquito infectado; após este evento o vírus passa por um período de incubação de 3 a 14 dias, depois a pessoa pode experimentar um ataque de febres acompanhadas de uma variedade de sinais que podem começar com um quadro assintomático ou uma febre leve, até uma severa febre e a fatal dengue hemorrágica. Durante o período agudo de febres, que pode ser no mínimo de 2 dias e máximo de 10, o vírus pode circular na corrente sangüínea, e outro mosquito picar ser contagiado, desta maneira pode se iniciar o ciclo de transmissão epidemiológica da doença. O período de incubação do vírus no mosquito é de 8 a 12 dias, após este lapso de tempo pode contagiar pessoas não infectadas (Gubler 1998).

Apesar de a dengue ser conhecida como entidade clínica desde mais de dois séculos e do conhecimento acumulado no percurso dos últimos anos, esta arbovirose é um dos principais problemas de saúde mundial, constituindo uma das prioridades da Saúde Pública no atual milênio (Periago & Guzman 2007). Segundo os dados da Organização Mundial da Saúde, em 100 países onde vivem aproximadamente 2500 milhões de pessoas há mais de 500000 casos da dengue e dengue hemorrágica a cada ano, com uma mortalidade de 25000 pessoas anualmente.

1.1.2 A dengue no Brasil

Em todo o território brasileiro, a luta contra a dengue é o objeto constante de campanhas de Saúde Pública da história. Registros desta doença são reportados nos 27 estados da federação, distribuídos por 3794 municípios, sendo responsáveis por cerca de 60% dos casos notificados nas Américas. A contribuição do número dos casos da dengue no Brasil está distribuída em sua maioria na região Nordeste com 48,3% das notificações totais, seguida em ordem decrescente, pelas regiões Sudeste com 37,2%, Centro-Oeste 7,6 %, Norte 5,7%, e Sul com 1,2% (Câmara *et al.* 2007). Para 2007 a Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, registrou no período de janeiro a julho, 438.949 casos da dengue clássica, 926 de febre hemorrágica da dengue e 98 óbitos (SVS/MS 2007). Quando comparado com o mesmo período de 2006, observa-se um aumento de 136.488 casos (figura 1).

1.1.3. A dengue no Estado do Paraná e região Sul

Como mencionado anteriormente, a região sul do Brasil contribui com 1,2% do total dos casos do País. Esta área está compreendida pelos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, no entanto, apenas o primeiro estado apresentou historicamente, até 2006, casos autóctones da dengue. Contudo, de janeiro a julho de 2007, o estado do Rio Grande do Sul apresentou o primeiro caso autóctone (SVS/MS 2007).

1.1.4 Prevenção e controle da dengue

A re-emergência da dengue, com aumento e expansão dos casos autóctones a novos lugares, como observado nos últimos 20 anos, tem alertado a todas as entidades de Saúde dos países que têm problemas com esta doença. Infelizmente,

as ferramentas disponíveis para prevenir a disseminação da dengue são limitadas, não existindo uma vacina efetiva, e as opções de controle do vetor são pouco efetivas. Sendo melhor estratégia prevenção da doença enfatizando em programas integrados de vigilância epidemiológica, educação ambiental e a integração da comunidade com respeito ao controle integrado do mosquito vetor (Gubler 1998).

A estratégia internacional proposta pelos países que compõem a Organização Mundial da Saúde consta de cinco elementos fundamentais: Controle seletivo e integrado do vetor com a participação da comunidade e com respaldo do governo; vigilância ativa da doença mediante o diagnóstico de laboratório e da vigilância entomológica, preparação das condições para enfrentar as situações de emergência, o desenvolvimento de capacidades e orientação de recursos humanos para pesquisa de métodos efetivos e eficazes de controle do vetor (Periago & Guzman 2007).

No Brasil, no ano 2002 foi implantado o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) que da continuidade algumas propostas do Plano de intensificação das Atividades de Controle da Dengue (PIACD). Enfatiza a necessidade de mudanças nos modelos anteriores como: 1) a elaboração de programas permanentes, pois não há qualquer evidência técnica de que a erradicação do mosquito seja possível a curto prazo; 2) o desenvolvimento de campanhas de informação e de mobilização da população, de maneira que cada família tenha responsabilidade da manutenção de seu ambiente livre de potenciais criadouros do vetor; 3) fortalecimento da vigilância epidemiológica, para ampliar a capacidade de predição e detecção rápida de surtos da doença; 4) melhoria da qualidade do trabalho de campo no combate ao vetor; 5) integração das ações de controle da dengue na atenção básica, com a mobilização do Programa de Agentes

Comunitários de Saúde (PACS) e do programa da família (PSP); 6) a utilização de instrumentos legais que facilitem o trabalho do poder público na eliminação de criadouros em imóveis comerciais, casas abandonadas etc; 7) a atuação multissetorial, no fomento à destinação adequada de resíduos sólidos e à utilização de recipientes seguros para armazenamento de água; 8) o desenvolvimento de instrumentos mais eficazes de acompanhamento e supervisão das ações desenvolvidas pelo Ministério da Saúde, Estados e Municípios (OPS 2002; Braga e Valle 2007).

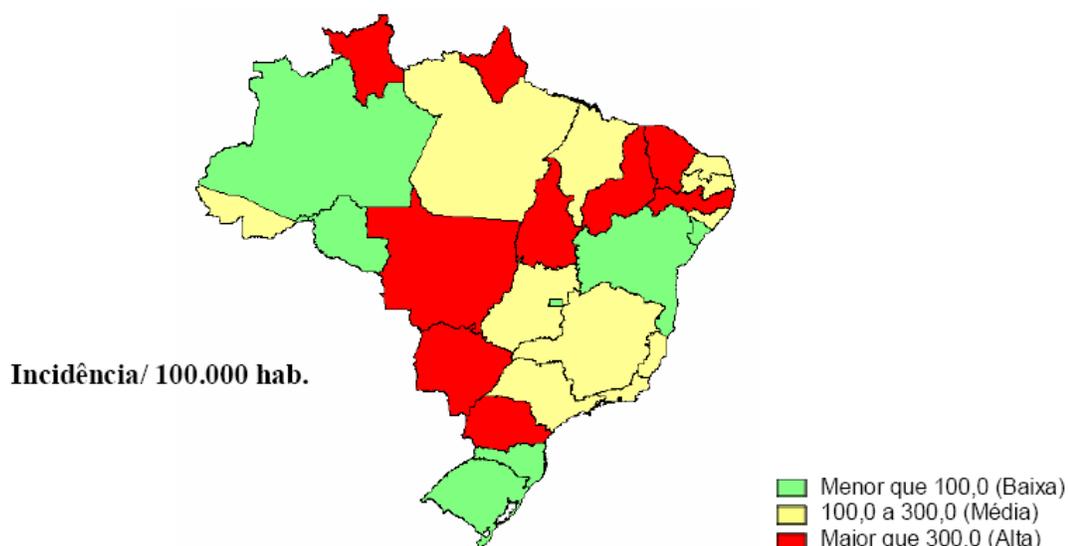


Figura 1. Incidência da dengue nos Estados de maior risco no Brasil em 2007 (Secretaria de Vigilância em Saúde Ministério da Saúde (SVS/MS)).

1.2 Os vetores da dengue

Aedes (Stegomyia) aegypti Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) oriundo do Velho Mundo é considerado o único vetor do arbovírus da dengue e dengue hemorrágica nas Américas. *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894, de introdução recente nas Américas, é uma espécie originária das regiões Oriental, Australásica, Oceânica e a Paleártica, de onde deriva seu nome de tigre asiático. Na atualidade, não possui papel relevante como vetor do arbovírus para as Américas. Este fato aponta que a maioria das ações de monitoramento sejam dirigidas com mais rigor ao controle de *A. aegypti* (Forattini 2002). O monitoramento de rotina para detecção dos focos de *A. aegypti* e *A. albopictus* consistem no levantamento de índices de infestação que servem como base para indicar se há um aumento dos níveis populacionais destas espécies baseados em dados de imaturos (ovos e larvas) e adultos (Funasa 2001).

1.2.1 Principais métodos de controle do *Aedes aegypti*

Os principais métodos de controle utilizados no Brasil para combater o vetor recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) são: temefós granulado a 1% (Abate[®], Larvin[®], Larvel[®] e outros) que é um inseticida de baixa toxicidade para mamíferos; *Bacillus thuringiensis var israelensis* (BTI), que é um inseticida biológico utilizado de maneira rotativa com o temefós, como método para evitar surgimento de resistência. O metoprene, substância análoga ao hormônio juvenil dos insetos, que atua nas formas imaturas (larvas e pupas), impedindo o desenvolvimento dos mosquitos para a fase adulta. Para o estágio adulto, utiliza-se o tratamento perifocal à base de inseticidas piretróides de alto poder residual, como a cipermetrina e

tratamento a ultrabaixo volume (UBV), utilizado apenas em surtos epidêmicos (Funasa 2001).

O tratamento com o inseticida químico temefós é a forma mais freqüente de combate na maioria dos países que enfrentam problemas com a dengue, e o Brasil não é exceção. Os registros indicam que a utilização deste produto data de um histórico de mais de 40 anos de aplicações (Ministério da Saúde 1968), o que sem dúvida pode ter contribuído, para que houvesse municípios com populações de *A. aegypti* capazes de tolerar doses que normalmente causariam mortalidade a indivíduos susceptíveis (Macoris *et al.* 1999, Campos & Andrade 2001, Macoris *et al.* 2003, Lima *et al.* 2003, Braga *et al.* 2004 e Carvalho *et al.* 2004, Duque *et al.* 2004, Lima *et al.* 2006, Beserra *et al.* 2007).

1.2.2 Métodos de avaliação da perda de susceptibilidade do *Aedes aegypti* ao temefós

Geralmente, a metodologia utilizada para detectar a existência de um processo de seleção a um inseticida é avaliada por meio de bioensaios estabelecidos pela OMS, avaliando se há perda de susceptibilidade a um produto “x” que não causa a mortalidade esperada a uma concentração diagnóstica (CD), que normalmente ocasionaria a mortalidade a uma cepa totalmente susceptível, ou em termos práticos, determina resistência química.

Devido à necessidade de ter resultados de susceptibilidade que possam ser comparados em relação ao processo metodológico entre diferentes países, alguns critérios são acompanhados da seguinte forma: Avaliação da concentração diagnóstica, a maioria dos estudos utilizam 0.0125 mL de temefós (grau técnico) como parâmetro de referência (WHO 1992) e uma minoria dos trabalhos adotam

uma concentração que é calibrada sob as condições do laboratório onde é elaborado o teste piloto, que corresponde a duas vezes a concentração letal que ocasiona mortalidade ao 99% dos indivíduos analisados (CL_{99}) da colônia Rockefeller CDC [exemplo, $CD = CL_{99} 0.0030 \text{ ppm} * 2$, o resultado seria $CD = 0.0060 \text{ ppm}$] (WHO 1981, Lima *et al.* 2003, Macoris *et al.* 2003, Braga *et al.* 2004). Dentre estas CD, a $CL_{99} X * 2$, detecta com rigor o nível de resistência (Macoris *et al.* 2005) e estabiliza os possíveis erros experimentais entre laboratórios.

Para o caso anterior do teste qualitativo CD é necessário antes realizar uma curva de calibração com a colônia Rockefeller para determinar as concentrações letais (CL), de 1 a 99%. Incluindo um controle (sem inseticida) para observar a resposta de letalidade da colônia localidade “x” em paralelo com a Rockefeller. Desta forma, são observados dados detalhados da ação do produto avaliado, como a porcentagem de mortalidade em relação a cada concentração, CL 1 a 99%, intervalo de confiança das CLs e a análise estatística do experimento (Finney 1971). Para uma descrição mais detalhada da seleção das concentrações, número de indivíduos a analisar e todo o processo que envolve um experimento utilizando pesticidas em artrópodes, deve ser visto Robertson & Preisler (1992).

Após selecionar a CD, são comparados os resultados com critérios que medem a tolerância ao produto analisado, sendo assim: Resposta de mortalidade à concentração diagnóstico superiores a 98% considera-se como susceptível, entre 98–80% indicam um processo insipiente de modificação da susceptibilidade, e menores de 80% confirmam que a resistência está presente (Davidson & Zahar 1973). Para medir o grau de resistência é comparado a divisão da Cl_{50} ou Cl_{95} (alguns casos Cl_{90}) da colônia “x” com a Cl_{50} ou Cl_{95} (alguns casos Cl_{90}) da Rockefeller, cujo produto resultante é conhecido como a razão de resistência (RR_{50} ,

RR₉₀ ou RR₉₅). O critério para medir grau de resistência é RR menor de 5 vezes, “status” de baixo, entre 5 e 10 considera-se médio e acima de 10, alto (Mazzari & Georghiou 1995).

1.3 Resistência a inseticidas

O desenvolvimento da resistência a pesticidas geralmente é considerado um dos principais problemas no controle de insetos praga. O primeiro registro data de 1908 por Melander (1914), que observou um inesperado grau de sobrevivência de *Quadraspidotus perniciosus* Comstock (Hemiptera: Diaspidae), depois de tratado com óxido de enxôfre (lime sulfúrico) em Clarkston (Valley of Washington). Para mosquitos, começou a ser detectada em 1947 ao DDT [1,1,1-tricloro-di-(4-chlorophenyl) ethane] em indivíduos de *Aedes taeniorhynchus* Wiedemann, 1821 e *Aedes sollicitans* Walkers, 1856 (Diptera : Culicidae) na Flórida, Estados Unidos (Brown 1986).

1.3.1. Definição

Resistência a pesticidas é o desenvolvimento de uma habilidade em uma população de indivíduos a tolerar doses tóxicas, que podem ser letais a indivíduos da mesma espécie, considerando-se distinta da susceptibilidade natural mostrada por indivíduos da mesma espécie devido a fatores diferentes aos componentes químicos do pesticida (Stenersen 2004).

A resistência *cruzada* é um fenômeno pelo qual uma população de indivíduos torna-se tolerante a dois ou mais pesticidas como resultado da seleção de um único princípio ativo do produto. Em quanto que a *múltipla* é induzida rapidamente em algumas espécies por simultâneas ou sucessivas exposições a dois ou mais

pesticidas; diferente da cruzada é conferida por vários princípios ativos que possam estar incluídos no produto (Stenersen 2004).

1.3.2 Mecanismos que conferem a resistência

Pode-se classificar em *resistência por alteração comportamental*, quando o indivíduo não entra em contacto ou evita o inseticida; *redução à penetração*, neste caso a composição do exoesqueleto é modificada a um grau que inibe a penetração do pesticida; *sítio – alvo*, o lugar de ação do pesticida se modifica, reduzindo a sensibilidade ao ingrediente ativo do pesticida; *resistência metabólica*, a via metabólica do inseto é modificada detoxificando por meio de enzimas a ação do pesticida ou impedindo a metabolização do composto em sua forma tóxica. Nos insetos, os mecanismos mais importantes que atuam neste processo, são o sítio alvo e a resistência metabólica. A resistência fisiológica pode ser caracterizada como o resultado de uma interação destes fatores e inclui reduzida penetração, retenção e excreção do ingrediente ativo do inseticida (Bisset 2002).

1.3.3 Resistência como uma característica inerente da evolução

Está estabelecido que a evolução da resistência em diferentes velocidades depende das características biológicas das espécies envolvidas. Isto é uma consequência das diferenças morfológicas e adaptação ao ambiente conferida pelo código genético dos indivíduos. Um inseto como a mosca das frutas tem 13.601 genes, e em cada um pode apresentar centenas de alelos. Novos alelos podem se formar por mutações e os genes podem também se duplicar, aumentando o “pool” genético da espécie. Muitos destes alelos são raros, porém se ocorrer alteração das condições normais, e estas se tornaram favoráveis à sobrevivência e reprodução,

podem em poucas gerações aumentar a frequência da população. No caso da família de enzimas, as CYP, frequentemente referidas como as cito- cromo P450 atuam numa diversidade de funções oxidativas envolvidas na resistência, têm a capacidade de catalisar oxidando e detoxificando uma ampla variedade de substâncias. A mosca das frutas, por exemplo, têm incorporado no genoma 90 genes que codificam este tipo de enzimas. Justamente, um alelo, considerado como raro, pode replicar um aminoácido que produz uma enzima que é ativa na degradação de um inseticida específico, exemplo a piretróides e carbamatos, originando a resistência (Stenersen 2004).

1.3.4 Fatores que contribuem com a seleção de resistência a inseticidas

Como foi exposto anteriormente, o aparecimento da resistência a inseticidas é um processo inerente da proteção das populações a um agente tóxico. No entanto, existem fatores que pressionam o aparecimento deste fenômeno em diferentes intensidades. Estes fatores estão agrupados em três categorias que fazem referência à resistência genética, biológica-ecológica e por controles operacionais (Tabela 1). Dentre estes fatores, apenas os operacionais podem ser controlados pelo homem, no sentido de obter diminuição no aparecimento da resistência (aplicação de pesticidas)(Georghiou & Taylor 1986).

Tabela I: Fatores que influenciam surgimento da resistência a inseticidas (Georghiou & Taylor 1986).

I. Genéticos	<ul style="list-style-type: none"> a. frequência de alelos R (resistentes) b. Numero dos alelos R c. Dominância dos alelos R d. Penetração, expressividade e interações dos alelos R e. Resistência conferida por outros inseticidas f. Boa introdução ao genoma da resistência
II. Biológicos-ecológicos	<ul style="list-style-type: none"> 1. Bióticos <ul style="list-style-type: none"> a. Múltiplas gerações em períodos curtos b. Indivíduos por geração c. Monogamia, poligamia e partenogêneses 2. Comportamento-ecologia <ul style="list-style-type: none"> a. Isolamento, mobilidade e migração b. monofagia, polifagia c. sobrevivência acidental e refúgio
III. Operacional	<ul style="list-style-type: none"> 1. O produto químico <ul style="list-style-type: none"> a. Características do pesticida b. Relação com o produto utilizado anteriormente c. Efeito residual do inseticida e formulação 2. A aplicação <ul style="list-style-type: none"> a. Limiar da aplicação b. Seleção do limiar do inseticida c. foco da aplicação (larva ou adulto) d. Modo da aplicação e. Tempo selecionado para a aplicação f. Produto alternativo

1.4. O problema da dengue no estado do Paraná

A região Sul, que historicamente apresentou apenas 1,2% dos casos do total do Brasil; em 2007 (período, janeiro-julho) atingiu o patamar de 10,2% (SVS/MS 2007). Este aumento é realmente significativo, e é importante destacar vários elementos. Primeiro, que as dimensões continentais do país não são um parâmetro eqüitativo para ter uma idéia desta problemática no Estado do Paraná. E segundo, países de fronteira com o Paraná que possuem extensões geográficas maiores, como Argentina e Paraguai, apresentam um número menor ou equivalente de casos. Isto pode ser comprovado fazendo a somatória dos casos apresentados nas páginas da Organização Pan-Americana da Saúde e da Secretaria do Estado da Saúde do Paraná.

Por outro lado, é necessário destacar que estudos epidemiológicos da dengue no Estado do Paraná são necessários, porém inexistentes, sendo esta a principal motivação para elaborar esta tese. Os dados disponíveis pela Secretaria do Estado da Saúde do Paraná são uma fonte de dados que podem ser muito mais explorados quanto a datas e número de casos autóctones e importados. Outras análises podem informar aspectos chave para entender o porquê, dos surtos da dengue, como os que se têm apresentado em alguns dos anos, principalmente no período 2002-2003 e 2006-2007. Por esta razão, se justifica a realização de um trabalho inicial que explore os componentes históricos de casos da dengue, no sentido de organizar a informação de forma que se apresente um panorama do passado e as perspectivas para o futuro. Dentro deste enfoque, têm-se algumas questões a pesquisar, necessárias para estabelecer as bases informativas que sirvam para compreender o perfil epidemiológico da dengue no Paraná.

Hipóteses: a) Os casos da dengue no período 1995-2007 do Estado do Paraná, referente aos municípios com maior incidência, estão, aparentemente relacionados, com as áreas de fronteira nacional (São Paulo e Mato Grosso do Sul) e internacional (Paraguai e Argentina). *Justificativa:* a caracterização da distribuição geográfica de localidades onde se encontram municípios críticos de alta incidência da dengue podem indicar padrões de dispersão da doença, auxiliando nos planos de combate ao vetor. Uma análise cruzada entre os componentes históricos de casos da dengue entre áreas de fronteira (exemplo, áreas que circundam os municípios, nacionais ou internacionais) junto com monitoramento da susceptibilidade, podem também trazer informações úteis, principalmente na direção onde o fluxo da dengue é mais abundante em relação ao número de casos e incidência da doença.

b) As populações de *Aedes aegypti* distribuídas pelo Estado do Paraná apresentam modificações de susceptibilidade que indicam que há um processo de resistência atuando. *Justificativa:* as evidências de resistência apresentadas para outros estados do Brasil indicam a necessidade de monitorar permanentemente este fenômeno, devido à existência da possibilidade de dispersão, sendo que a determinação do perfil de susceptibilidade ao temefós das populações do *A. aegypti* paranaenses, é necessária.

c) A dinâmica de oviposição em relação a *A. aegypti* e *A. albopictus* em campo é similar em municípios com diferentes registros de dengue. *Justificativa:* pelo fato de o método para coletar o material para os testes de susceptibilidade, ser com armadilhas de oviposição (ovitrampas), algumas informações serão exploradas com este material, como a presença ou ausência de indivíduos de *A. albopictus* e/ou *A. aegypti*, coexistência destas espécies, abundância, distribuição espacial e proporção sexual, que devem ser analisadas, para determinar se há um padrão de

similaridade entre municípios. O potencial de informações que as armadilhas de oviposição podem apresentar não é bem explorado, dados sobre a ecologia e forma de colonização interespecífica podem servir como base para adequar o monitoramento destas espécies em campo. Um relacionamento com todos os aspectos propostos na tese pode auxiliar na explicação real do papel do temefós no controle da dengue.

1.5 Objetivos para responder às hipóteses

Para responder à hipótese (a) tem-se como **objetivo geral**: determinar se há um padrão de dispersão dos casos da dengue no Estado de Paraná. **Objetivos específicos**; revisar os últimos acontecimentos relacionados à transmissão de dengue no Estado do Paraná, incluindo uma análise da ocorrência, dispersão dos casos da dengue no Estado entre 1995 e 2007; e avaliar a relação destes casos entre áreas de fronteira nacional e internacional.

Para responder à hipótese (b) tem-se como **objetivo geral**: determinar se há um perfil de susceptibilidade ao temefós distribuído no Estado. **Objetivos específicos**; avaliar a susceptibilidade de larvas de terceiro instar final e quarto inicial de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós, estimando as CL_{50} e CL_{95} , RR_{50} e RR_{95} em populações coletadas em Curitiba, Paranaguá, Foz do Iguaçu, Cascavel, Paranaíba, Maringá, Ibiporã, Cambé, Londrina, Santa Mariana, Jacarezinho e Guairá; e determinar, através da atividade de oviposição na estação de inverno, se há diminuição nos índices de infestação de *Aedes* spp. que possam ser relacionados com o status susceptibilidade ao inseticida.

Para responder à hipótese (c) tem-se como **objetivo geral**: determinar se nas armadilhas de oviposição utilizadas para coleta de ovos ocorre, além de *A. aegypti*,

ou *A. albopictus*, como também ter informação ecológica que possa determinar a presença concomitante destas espécies. Os **objetivos específicos**: determinar a presença de *A. aegypti* e *A. albopictus* nos municípios de Jacarezinho, Maringá, Paranavaí, Cambé e Iporã; e analisar abundância entre as espécies, coexistência, eclosão, agregação dos ovos e relação entre sexos.

No contexto global da tese, tem-se, finalmente, como **objetivo**, simular um modelo matemático da dinâmica da doença e do vetor, que inclua perda de susceptibilidade a inseticidas, cobertura das aplicações do inseticida e hábitos de controle cultural da população como remoção de criadouros do mosquito, no sentido de observar as melhores estratégias para diminuir e prevenir a dengue.

Como a tese integra varias questões, e na tentativa de responder da melhor maneira às perguntas, os objetivos gerais que respondem as hipóteses foram divididos em capítulos da seguinte forma:

Capítulo I. “Estudo epidemiológico da dengue no Estado do Paraná: relação com as áreas de fronteira nacional e internacional período 1995-2007”. Neste capítulo, se apresentam processados os dados de ocorrência da dengue no período de 1995 a 2007, disponibilizados pela Secretaria Estadual da Saúde do Estado do Paraná; foi determinado o padrão de dispersão dos casos da dengue e a relação com as áreas de fronteira nacional e internacional.

Capítulo II. “Avaliação da resistência das populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera : Culicidae) ao inseticida organofosforado temefós e dinâmica de oviposição de *Aedes* spp. nas diferentes estações do ano, no Estado do Paraná, Brasil”. Neste capítulo, determinou-se o perfil de susceptibilidade das populações do vetor da dengue em relação ao inseticida temefós e se levantou a

possibilidade de que a baixa resistência estaria ligada à redução de aplicações de temefós, como consequência da sazonalidade do vetor.

Capítulo III. “Abundância e agregação de ovos de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) em municípios da Região Norte e Noroeste do Estado do Paraná, Brasil”. Este capítulo foi utilizado para determinar a presença do vetor e a dinâmica de oviposição de *Aedes* em armadilhas instaladas em condições campo.

Capítulo IV. “Modelo de transmissão da dengue: tratamento integrado do vetor *Aedes aegypti* considerando resistência química a inseticidas.” Este capítulo tenta mostrar, por meio de um modelo matemático, a relação da epidemia da dengue com a utilização de inseticidas e também, a importância do controle integrado do vetor. **O objetivo principal deste capítulo** foi reunir a informação obtida nos capítulos I, II e III no sentido de levantar possíveis diretrizes a serem tomadas no controle do vetor no Paraná.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Braga, I.A.; Lima, J.B.P.; da Silva, S.S & Valle D. 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **99**:199-203.
- Braga, I. A & Valle, D. 2007. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 16: 113-118.
- Beserra, E.B.; Fernandes, C.R.M.; Queiroga, M.F.C & Castro, F.P.Jr. 2007. Resistência de populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefós na Paraíba. **Neotropical Entomology** **36**: 303-307.
- Bisset, J.A. 2002. Uso correcto de insecticidas: Control de la resistencia. **Revista Cubana de Medicina Tropical** **54**: 202-219.
- Brown, A.W.A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review **Journal of the American Mosquito Control Association** **2**: 123-140.
- Campos, J & Andrade, C.F.S. 2001. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. **Revista de Saúde Pública** **35**: 232-6.
- Carvalho, M.S.L.; Caldas, E.D.; Degallier, N.; Vilarinhos, P de T.R.; de Souza, L.C.K.; Yoshizawa, M.A.C.; Knox, M.B & Oliveira, C. 2004. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to the insecticide temephos in the Federal District, Brazil. **Revista de Saúde Pública** **38**: 623-629.
- Câmara, P.F.; Theophilo, G.R.L.; Santos, T.G.; Pereira, G.S.R.F.; Câmara, P.D.C & Matos, R.R. 2007. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **40**: 192-196.
- Davidson, G & Zahar D.A. 1973. The practical implications of resistance of malaria vectors to insecticides . **Bull WHO** **49**: 475-483.

- Duque, J.L.E.; Martins, F.M.; Dos Anjos, F. A.; Kuwabara, E.F & Navarro-Silva, M.A. 2004. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas Temefos e Cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública** 38:842-843.
- Finney, D.J. 1971. **Probit Analysis**. Cambridge University Press, 3rd Edition.
- Forattini, P.O. 2002. **Culicidologia médica** 2^o volume. Editora Da Universidade de São Paulo. 860 pp.
- Fundação Nacional de Saúde - FUNASA. 2001. Programa Nacional de Controle da Dengue. Brasília: Ministério da Saúde.
- Fundação Nacional de Saúde - FUNASA 2002. Programa Nacional de Controle da Dengue. Brasília: Ministério da Saúde.
- Gubler, D. J. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews** 11: 480-496.
- Georghiou, G.P & Taylor, C. E. **Pesticide resistance: strategies and tactics for management**. Ed. National Research Council. National Academy Press, Washington DC. 157-169 pp.
- Lima, J.B.P.; Pereira da Cunha, M.; Silva-Jr, R.C.S.; Galardo, A.K.R.; Soares, S.S.; Braga, I.A.; Ramos, R.P & Valle, D. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 68: 329-333.
- Lima, E.P.; Oliveira, A.M.F.; Lima, J.W.O.; Ramos, A.N.J.; Cavalcanti, L.P.G & Pontes, R.J.S. 2006. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 39: 259-263.

- Macoris, M.L.G.; Andrighetti, M.T.M.; Nalon, K.C.R.; Garbeloto, V.C & Junior, A.L.C. 2005. Standardization of bioassays for monitoring resistance to insecticides in *Aedes aegypti*. **Dengue Bulletin 29**: 176-182.
- Macoris, M.L.G.; Andrighetti, M.T.; Takaku, L.; Glasser, C.M.; Garbeloto, V.C & Cirino VCB. 1999. Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública 33**: 521-522.
- Macoris, M.L.G.; Andrighetti, M.T.; Takaku, L.; Glasser, C.M.; Garbeloto, V.C & Bracco, J.E. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to Organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 98**: 703-708.
- Mazzari, M.B & Georghiou, G.P. 1995. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. **Journal of the American Mosquito Control Association 11**: 315-322.
- Melander, A.L. 1914. Can insects become resistant to sprays?. **Journal of Economic Entomology 7**: 167-173.
- Ministério da Saúde 1968. Endemias Rurais. Métodos de trabalho adotados pelo DNERu, Departamento Nacional de Endemias Rurais.
- Ministério da Saúde – Secretaria de vigilância em Saúde (SVS) 2007. Balanço da dengue Janeiro a Julho 2007 no Brasil. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/balanco_dengue_jan_jul_2007.pdf. Acessado em 24 novembro de 2007.
- OPS. 2002. El dengue en Brasil: situación actual y actividades de prevención y control. **Boletín Epidemiológico OPS 23**: 3-6

Periago, M.R & Guzmán, M.G. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas.
Revista Panamericana de Salud Publica/Pan Am J Public Health 21:187-191.

Robertson, J.L & Preisler, H.K. 1992. **Pesticide bioassays with arthropods.**
CDC Press. United States of America. 127 pp.

Stenersen, J. 2004. **Chemical pesticides: mode of action an toxicology.** CRC
Press. 276 pp

World Health Organization. 1981. Instructions for determining the susceptibility or
resistance of mosquito larvae to insecticides). Geneva; 1981.
(WHO/VBC/81.807).

World Health Organization. 1992. Vector Resistance to pesticides. Fifteenth
Report of The WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. **WHO
Tecnical Report Series. 818:1-62.**

2. CAPITULO I

Estudo epidemiológico da dengue no Estado do Paraná: relação com as áreas de fronteira nacional e internacional período 1995-2007

2.1. ABSTRACT

Epidemiologic study of dengue in the state of Paraná: relationship between national and international border areas in the period 1995-2007. The spatial and temporal distribution of dengue in the State of Paraná was analyzed from 1995 to 2007. Data of occurrence of autochthonous and allochthonous dengue cases in Paraná, provided by the Paraná State Health Department, were georeferenced considering the year as time unit and the municipality as space unity. The maps' analysis allowed the recognition of areas with higher dengue incidence and the direction of dispersion within the State. It is outstanding the occurrence of three epidemical waves with peaks in 1995/96, 2002/03 and 2006/07. Regarding the geographical distribution, the metropolitan regions of Londrina and Maringá and the city of Foz do Iguaçu, large urban centers, present a high number of dengue cases. These are not the municipalities with the highest incidence levels; nevertheless, they may act as dissemination poles. Considering the division of the State into mesoregions, it is possible to recognize one area for dengue's occurrence, according to the number of cases. The area that comprises the West, Mid-west, Northwest, Mid-north and the so-called "Pioneer North" mesoregions contributed with 98.47% of the total number of cases and with 99.98% of solely the autochthonous ones. These mesoregions present hot and humid climate, favoring the development of the vector *Aedes aegypti*. The occurrence of epidemic waves and the continuous cases of dengue are an indication of endemization of the disease in the State. Herewith, it is strategically vital to keep the entomological vigilance constant in areas of higher dengue incidence, as well as other areas with similar features, observing that the control of the vector *A. aegypti* is the main element for the disease control.

Key words. Epidemiology, dengue, spatial distribution, *Aedes aegypti*.

2.2. RESUMO

Estudo epidemiológico da dengue no Estado do Paraná: relação com as áreas de fronteira nacional e internacional período 1995-2007. Foi analisada a distribuição espacial e temporal da dengue no Estado do Paraná, entre 1995 e 2007. Dados de ocorrência dos casos autóctones e importados da dengue em cada município paranaense, disponibilizados pela Secretaria Estadual de Saúde do Paraná, foram georreferenciados considerando o ano como unidade de tempo e o município como unidade de espaço. A análise dos mapas permitiu reconhecer áreas com maior incidência da virose e a direção da dispersão no Estado. É notável a ocorrência de três ondas epidêmicas, com picos nos biênios 1995/96, 2002/03 e 2006/07. Com relação à distribuição geográfica, destacam-se as Regiões Metropolitanas de Londrina e Maringá e a cidade de Foz do Iguaçu, grandes centros urbanos e com grande número de casos da virose. No entanto, mesmo não sendo os municípios de maior incidência, podem atuar como pólos de disseminação da doença. Considerando a divisão do Estado em mesorregiões, é possível reconhecer uma grande área para a ocorrência da dengue, de acordo com o número de casos. A área formada pelas mesorregiões Oeste, Centro-Oeste, Noroeste, Norte-Central e Norte Pioneiro contribuíram com 98,47% do total de casos e 99,98% dos casos autóctones. Essas mesorregiões possuem clima quente e úmido, favorecendo o desenvolvimento do vetor *Aedes aegypti*. A ocorrência de ondas epidêmicas e presença permanente de casos da dengue é um indício de endemização da doença no Estado. Com isto, é estratégica a vigilância entomológica constante nas áreas com maior incidência da dengue, assim como as áreas com características próximas, visto que o controle do vetor *A. aegypti* é o principal elo a ser rompido para controle futuro da doença.

Palavras-chave. Epidemiologia, dengue, distribuição espacial, *Aedes aegypti*.

2.3. INTRODUÇÃO

A ocorrência do arbovírus da dengue vem sendo registrada de forma ininterrupta no Brasil desde o ano de 1986, quando uma grande epidemia atingiu a região metropolitana do Rio de Janeiro (Nogueira *et al.* 1990). Desde então, a virose se espalhou pelos grandes centros urbanos de todas as regiões brasileiras, transformando-se no principal problema de saúde pública no Brasil nas últimas duas décadas.

O crescimento da doença no país está diretamente relacionado ao aumento na distribuição, tanto do vírus da dengue como do vetor *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae). Dos quatro sorotipos existentes, DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4, apenas o último ainda não circula no Brasil (Câmara *et al.* 2007). O DEN-1 foi introduzido no país no ano 1986; o DEN-2 em 1990 (Nogueira *et al.* 1990, Nogueira *et al.* 1999), e o DEN-3 em 2001 (Nogueira *et al.* 2001), todos no Estado do Rio de Janeiro. No ano de 2004, os três sorotipos estavam co-circulando em 22 dos 27 Estados brasileiros (Siqueira *et al.* 2005), e desde 1998 o vetor da dengue está presente em todos os estados do país (FUNASA 2001, 2002).

Trabalhos recentes mostram o notável crescimento no número de casos da dengue e de Estados atingidos pela virose, especialmente a partir dos anos de 1994 e 1995, quando as epidemias passaram a ocorrer em intervalos menores de tempo e com intensidade maior, atingindo um número maior de municípios e de Estados (FUNASA 2002, SVS 2004, Texeira 2002).

O Paraná teve seus primeiros casos autóctones da dengue registrados em 1995. Desde então a ocorrência de epidemias anuais se tornou comum no Estado, embora o número de casos seja menor quando comparada com o restante do

território brasileiro (Câmara *et al.* 2007). Na tentativa de conhecer melhor as raízes deste fenômeno, algumas questões podem ser levantadas para entender a origem do aumento no número de casos e prever a magnitude de novas epidemias.

Dentro desta perspectiva, temos por objetivos ordenar cronologicamente as informações existentes em relação a esta doença no Estado, no período 1995 a 2007, que permitam determinar se há alguma influência indireta com as áreas de fronteira nacional (São Paulo e Mato Grosso) e internacional (Argentina e Paraguai), que historicamente apresentam um número crescente de casos.

2.4. MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O Estado do Paraná localiza-se na região Sul do Brasil, entre as latitudes de 22° 29' 30" e 26° 42' 59". Possui um território de 200.000 km², limitando-se ao norte com o Estado de São Paulo, ao leste com o Oceano Atlântico, ao sul com o Estado de Santa Catarina e a oeste com Mato Grosso do Sul, Paraguai e Argentina (Maack 2002). O Paraná está administrativamente dividido em 399 municípios, que, por sua vez, estão agrupados em 10 mesorregiões distintas, de acordo com características geográficas e climáticas específicas. A população total do Estado no ano de 2005 era de 10 155 274 habitantes (IBGE 2006).

Levantamento dos dados epidemiológicos

O presente estudo avaliou a ocorrência dos casos da dengue no estado do Paraná entre os anos de 1995 e 2007. Foram utilizados dados referentes ao número total de casos de dengue registrados pela Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA/PR), divididos em casos autóctones e casos importados. Para a análise da

distribuição temporal e espacial dos casos utilizou-se o ano como unidade de tempo e o município como unidade geográfica. Os dados diferenciados por municípios dos anos 2006 e 2007 não foram ainda disponibilizados pelo Ministério da Saúde, apenas é informada a somatória dos dados totais do Estado do Paraná.

Para verificar a relação entre áreas de fronteira nacional e internacional foram utilizados dados totais de casos confirmados da dengue no período de 1995 - 2007 do Ministério da Saúde (2006), para São Paulo e Mato Grosso e da Organização Pan-Americana da Saúde (2007), para Argentina e Paraguai.

Geoprocessamento dos dados da dengue no Paraná

Todos os casos e registros de populações resistentes foram georreferenciados com o uso do *software ArcView GIS 3.2a* (1999), produzindo mapas com a distribuição espacial da virose no Estado de 1995 a 2005. A análise dos mapas permitiu visualizar áreas de circulação da virose e o sentido direcional da dispersão dos casos no Estado. Foi realizada também uma análise de correlação de Pearson (r), relacionando o número de casos totais do Brasil, Mato Grosso, São Paulo, Argentina e Paraguai, com o intuito de observar qual área de fronteira apresentava maior relação entre o número de casos com o Estado do Paraná.

2.5. RESULTADOS

Foram registrados 73 159 casos da dengue no Estado do Paraná entre 1995 e 2007, desses, 71 610 casos foram autóctones (97,8%) e 1.549 casos importados (2,1%). O número total de casos no Brasil no mesmo período de tempo foi 4.060.616, sendo que a porcentagem que corresponde ao Paraná é de apenas 1,8%. Detectou-se uma correlação positiva, não significativa ($r = 0.26$, $p = 0.32$),

entre a incidência do Paraná, quando comparados com os da incidência do Brasil (Figura 1). Com isto se presume que há outros fatores externos ao estado que estão contribuindo no aumento dos casos da dengue. Também é observada na taxa de incremento anual (IA), onde, o Paraná apresenta taxas superiores de aumento em relação ao Brasil (Tabela I).

Dos 399 municípios paranaenses, 236 (59,15%) notificaram um ou mais casos da dengue no período estudado, sendo que em 139 deles (34,84%) foram confirmadas ocorrências autóctones. A evolução temporal da virose indica que em todos os anos ocorre um número expressivo de casos autóctones em relação ao total de ocorrências (Figura 2). A mesma figura mostra que o número de municípios afetados flutua proporcionalmente em relação ao número de casos. Indicamos como exceção o ano de 2003, onde apenas a cidade de Londrina contribuiu com mais de 64% do total de casos.

Tabela I: Total de casos da dengue no período 1995 a 2007 no Brasil e no Estado do Paraná (Adaptado da Secretaria de Vigilância em Saúde de Ministério da Saúde (SVSMS)).

Anos	Brasil Casos totais	Taxa IA Brasil	Incidência x 10 000	Paraná Casos totais	Taxa IA Paraná	Incidência x 10 000
1995	112887	-	6,0	1861	-	0,2
1996	106818	0,9	5,7	3195	1,7	3,1
1997	254074	2,3	13,5	13	0,004	0,0
1998	535283	2,1	28,5	583	44,8	0,6
1999	204201	0,38	10,9	309	0,5	0,3
2000	231412	1,1	12,3	1851	5,9	1,8
2001	412388	1,7	21,9	1288	0,6	1,3
2002	778037	1,8	41,4	5149	3,9	5,1
2003	323894	0,4	17,2	9025	1,7	8,9
2004	112962	0,3	6,0	86	0,009	0,1
2005	203789	1,8	10,8	912	10,6	0,9
2006	345922	1,6	18,4	5196	6,9	5,1
2007*	438949	1,2	23,3	43691	8,4	43,0
Total	4.060.616		215,9	73.159		70,4

*Dados período Janeiro a Junho de 2007. Taxa de incremento anual (IA)= ano anterior/próximo ano.

Durante o período analisado, ocorreram três ondas epidêmicas no Estado do Paraná com picos de incidência nos biênios 1995-96, 2002-03 e 2006-07 (Figuras 1 e 2). O primeiro deve estar relacionado ao início das epidemias no Estado, onde a população ainda não havia sido exposta ao vírus. O segundo pico de incidência está associado à grande epidemia de dengue que atingiu todo o país em 2002, com a entrada do DEN-2 no Brasil. Esse sorotipo atingiu o Estado do Paraná apenas em 2003, causando a segunda maior epidemia da história do Estado, com os quatro primeiros casos de febre de dengue hemorrágica (FHD), dois deles evoluindo para a morte. Para a terceira onda é difícil atribuir uma explicação, no entanto pode-se inferir através da co-circulação dos sorotipos do vírus da dengue DEN1, DEN2 e DEN3 que a população pode estar imune alguma das variações do vírus, tendo, imunidade apenas para um soro tipo. Ou que simplesmente o vetor está mais amplamente em contacto com o hospedeiro do que em anos anteriores (SVS/MS 2007).

Na teoria, pessoas expostas a um sorotipo não se infectam novamente com o mesmo, a não ser que sejam infectadas com um sorotipo distinto (Gubler 1998). Insinuando que pessoas não imunes ou susceptíveis estão sendo infectadas em novos lugares, isto claramente deve estar relacionado a um aumento da dispersão do vetor a novas áreas não determinadas como de alto risco e com população não imune ao sorotipo circulante. No município de Ubatã sem histórico de casos da dengue, por exemplo, dos 750 casos reportados foram confirmados 535 casos e igualmente em Santa Helena com 428 casos notificados e 221 confirmados, correspondente a março de 2007.

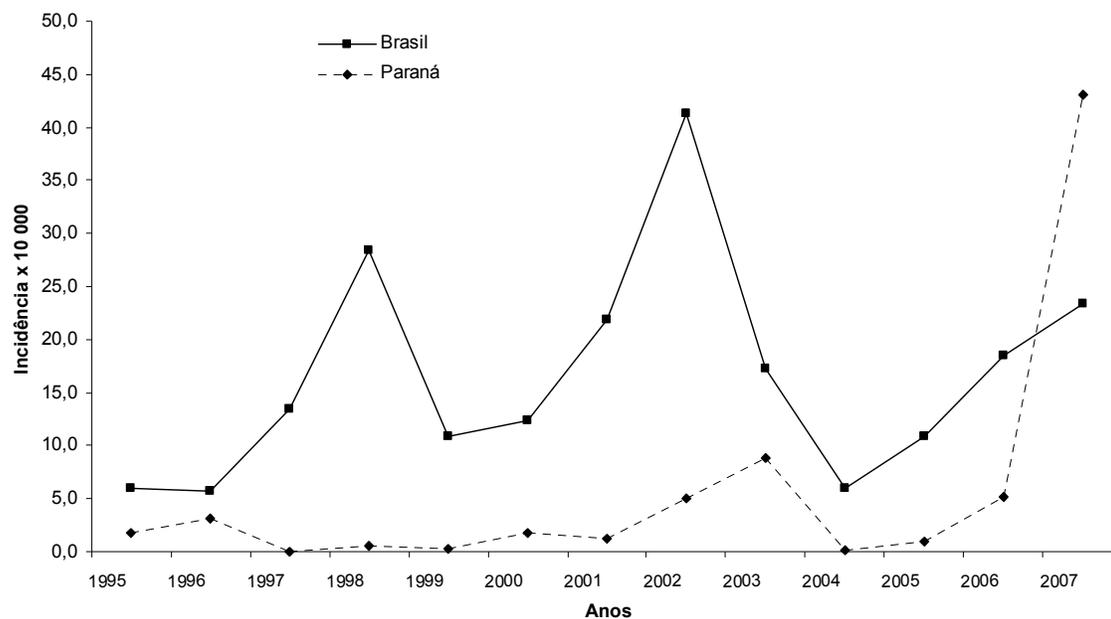


Figura 1. Incidência da dengue no Brasil e no Estado do Paraná entre o período de 1995 a 2007. Os dados de 2007 são apenas do período janeiro a julho (Adaptado da Secretaria de Vigilância em Saúde de Ministério da Saúde (SVSMS)).

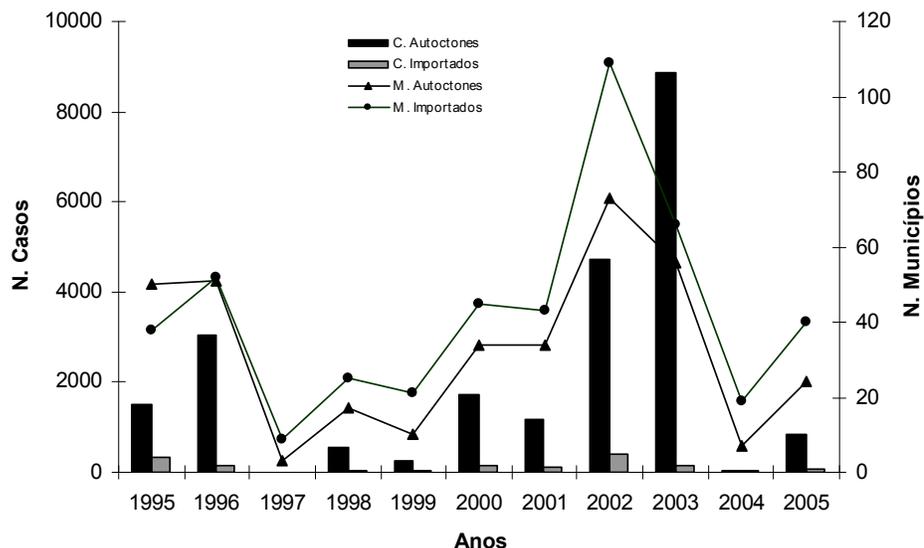
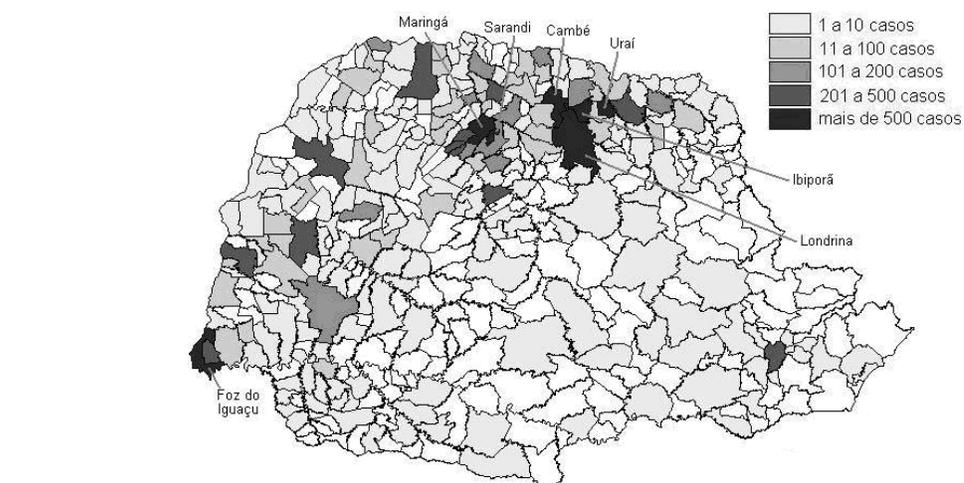


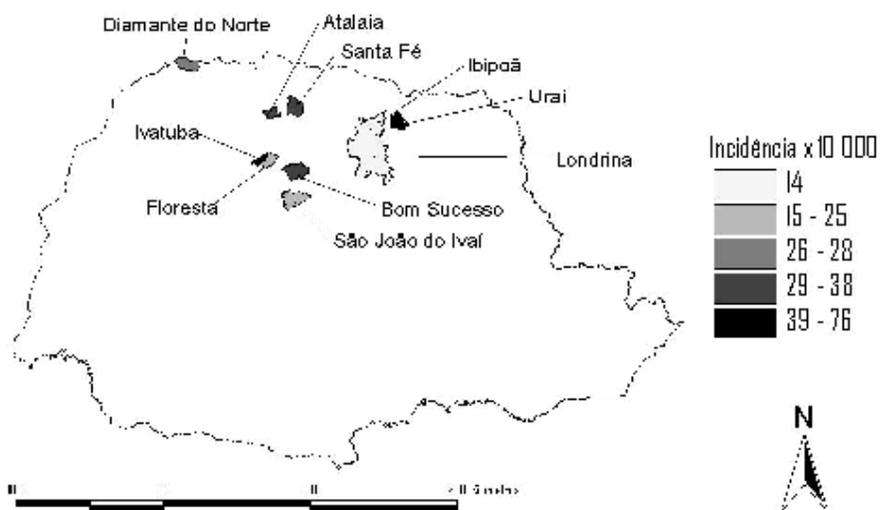
Figura 2. Número de casos autóctones e importados, número de municípios com registro de casos autóctones e importados da dengue no Estado do Paraná no período de 1995 a 2005 (Adaptado dos dados da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA/PR)).

A análise espacial dos casos mostra disseminação da dengue pelo Estado, mesmo que a maioria das cidades tenha apresentado um número inferior a 10 casos (Figura 3a). Considerando apenas os municípios com maior incidência (Figura 3b), pode-se observar um padrão diferente, sendo que estes municípios não são os principais pólos turísticos ou econômicos.

Os municípios de Londrina, Maringá e Foz do Iguaçu contribuíram no total com 40% de casos no período 1995-2007 e com 36,38% dos casos no período 2006 e 2007 (Tabela II). Esse quadro permite indicar a tendência de três localidades de grande ocorrência da dengue no Estado do Paraná.



a)



b)

Figura 3. a) Distribuição do total de casos da dengue no Estado do Paraná entre 1995 e 2005; b) Os dez municípios com maior incidência da dengue no Estado do Paraná, entre 1995 e 2005 (Adaptado dos dados da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA/PR)).

A primeira localidade é formada pela cidade de Londrina, acrescido pelas cidades de Cambé e Ibiporã, pertencentes à Região Metropolitana de Londrina (RML) e pela cidade de Uraí, localizada próxima a RML. Londrina é a cidade que teve o maior número de notificações no período de 1995-2007, especialmente no que concerne os casos autóctones. A cidade merece destaque também por ter notificado os primeiros casos de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) no Estado, em 2003. Nesse ano, foi registrada no município a segunda maior epidemia de dengue da história do Paraná, com 5.846 casos confirmados, 82% do total de registros no município desde 1995. No entanto, esse panorama mudou em 2007, sendo que Maringá foi a cidade com maior contribuição (8.166 casos).

O município de Maringá aparece como a segunda localidade de maior número de casos, acrescido pela cidade de Sarandi, pertencente à Região Metropolitana de Maringá (RMM). A maior epidemia da dengue registrada no município foi também a primeira no Estado, em 1995. Em 2002, no entanto, um novo grande surto voltou a ocorrer no município.

Finalmente, a terceira localidade de grande incidência de dengue no Estado é formada pelo município de Foz do Iguaçu. Destaca-se por um padrão distinto de ocorrência da virose. Em um pequeno intervalo de tempo, entre 1998 e 2002, ocorreram três ondas epidêmicas, separadas uma da outra por apenas um ano.

É importante complementar que outros municípios com menor população, porém com alta incidência como os apresentados na Tabela III, devem tomar-se com cuidado especial, pois estes podem influenciar os surtos epidêmicos dos grandes núcleos do estado como consequência de que em estes as atividades de controle talvez sejam menores que lugares considerados como pólos turísticos ou de interesse comercial.

Observou-se que a dispersão dos casos 1995-2007 em relação à incidência da dengue entre áreas de fronteira no Estado do Paraná correlacionou-se positivamente na seguinte ordem: com Mato Grosso ($r = 0.96$, $p = 0.000$), Paraguai ($r = 0.71$, $p = 0.006$), São Paulo ($r = 0.6$, $p = 0.02$) e negativamente com Argentina ($r = -0.15$, $p = 0.61$) (Figura 4). As correlações indicam que o número de casos no Estado pode ser influenciado pelas áreas de fronteira nacional com MS, SP e internacional com Paraguai. Dentro deste contexto, observa-se que o Mato Grosso do Sul tem o histórico de mais alta incidência quando comparado com São Paulo, Paraguai e Argentina (Tabela IV).

A presença do Anel de Integração Rodoviário do Paraná possibilita uma interconexão entre as principais áreas epidêmicas dentro do Estado e os principais centros regionais, nacionais e internacionais, que pode contribuir com a distribuição da dengue a vários lugares. Como a BR 277 que corta todo estado desde a região litorânea até Foz do Iguaçu, a BR 376, que liga a Região Metropolitana de Curitiba à Região Metropolitana de Londrina e Maringá e a BR 369 ligando o município de Foz do Iguaçu até a região Norte Central do Estado do Paraná (Figura 5).

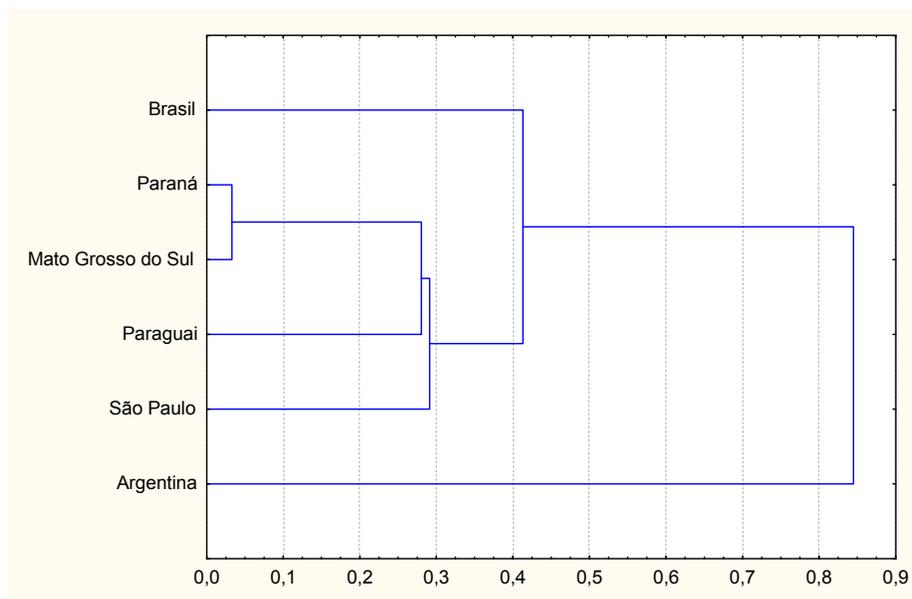


Figura 4. Distância de correlação da dengue nas áreas de fronteira do Paraná, entre o período de 1995 a 2007 (Adaptado dos dados da Secretaria de Vigilância em Saúde de Ministério da Saúde (SVSMS) e da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS)).

Tabela II. As três cidades com maior número de casos da dengue no Estado do Paraná, no período de 1995 a 2007 (Adaptado da Secretaria de Vigilância em Saúde de Ministério da Saúde (SVSMS)).

Municípios	Incidência X 10.000	Total de Casos	% do Total período 1995-2007*	% 2007 *	% 2006
Londrina	227	11258	15	7	21
Maringá	315	10248	14	19	-
Foz do Iguaçu	282	8727	11,9	10	17

* Dados período janeiro a junho 2007

Tabela III. As dez cidades com maior incidência de casos de dengue no Estado do Paraná, no período de 1995 a 2005 (Adaptado dos dados da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA/PR)).

Município	Incidência X 10.000	Total de Casos
Ivatuba	761	229
Uraí	665	720
Santa Fé	377	339
Atalaia	353	139
Bom Sucesso	350	108
Diamante do Norte	282	141
São João do Ivaí	246	262
Floresta	228	127
Londrina	143	7111
Ibiporã	135	641

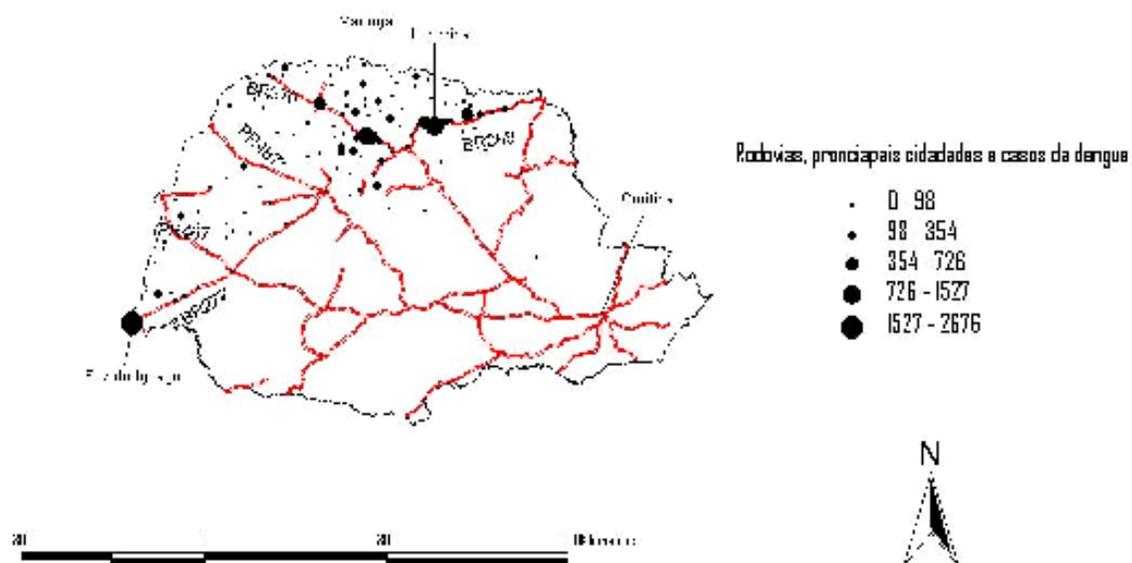


Figura 5. Principais rodovias e casos da dengue no Estado do Paraná, Brasil entre o período 1995 a 2005 (Adaptado dos dados da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA/PR)).

Tabela IV. Incidência da dengue por cada 10000 habitantes nos Estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná e nos países Paraguai e Argentina, entre o período de 1995 a 2007 (Adaptado da Secretaria de Vigilância em Saúde de Ministério da Saúde (SVSMS)).

Ano	São Paulo	Mato Grosso do Sul	Paraguai	Argentina
1995	1,5	18,2	0,0	0,0
1996	1,7	12,0	0,0	0,0
1997	0,5	17,8	0,0	0,0
1998	2,6	9,2	0,0	0,3
1999	3,7	29,3	1,8	0,0
2000	0,9	24,4	38,3	0,6
2001	12,6	39,0	0,1	0,0
2002	9,5	69,2	2,9	0,1
2003	5,0	25,9	0,2	0,0
2004	0,7	6,6	0,3	1,1
2005	1,4	8,4	0,6	0,0
2006	13,1	56,4	6,7	0,1
2007*	14,5	257,5	44,3	0,1
Total	67,7	573,9	95,2	2,2

* Dados período Janeiro a Junho 2007

As características climáticas do Estado também contribuem com o padrão epidemiológico observado. Duas classificações climáticas podem ser delimitadas de acordo com o sistema de classificação de Köppen, baseado na vegetação, temperatura e pluviosidade: o Cfa, que é um clima subtropical, com verões quentes, temperatura média no mês mais quente acima dos 22°C, geadas pouco frequentes e

tendência de concentração das chuvas nos meses de verão e o Cfb, que é um clima temperado, com temperatura média no mês mais quente abaixo dos 22°C, com verões mais frescos (IAPAR 2002) (Figura 6b).

A primeira grande área (clima subtropical) seria mais propícia ao desenvolvimento do mosquito, e uma comparação das Figuras **6a** e **6b** revelam relação entre as áreas ocupadas pelo mosquito e o clima, como caracterizado na Figura **6c**. Assim é explicado o porquê da dispersão no período 1995 até 2005, restrita nessa grande área (Figura 7 a 10). Na análise de dispersão, observa-se uma particularidade nas ondas epidêmicas, como exemplos: na Figura 7, período 1995-1997, após um surto epidêmico, a distribuição dos casos dispersam-se amplamente e logo se retrai significativamente. Logo, inicia o mesmo padrão de alta distribuição não necessariamente acompanhada de um número alto de casos (Figura 8), até atingir uma significativa distribuição de municípios e número de casos (Figura 9), seguidas de uma redução (Figura 10). Isto pode ser explicado apenas com hipótese de duas formas, um recesso pela intensificação das atividades de controle no surto epidêmico e a imunização da população alcançada em altas densidades nos hospedeiros (humanos) pelo menos ao sorotipo circulante no surto.

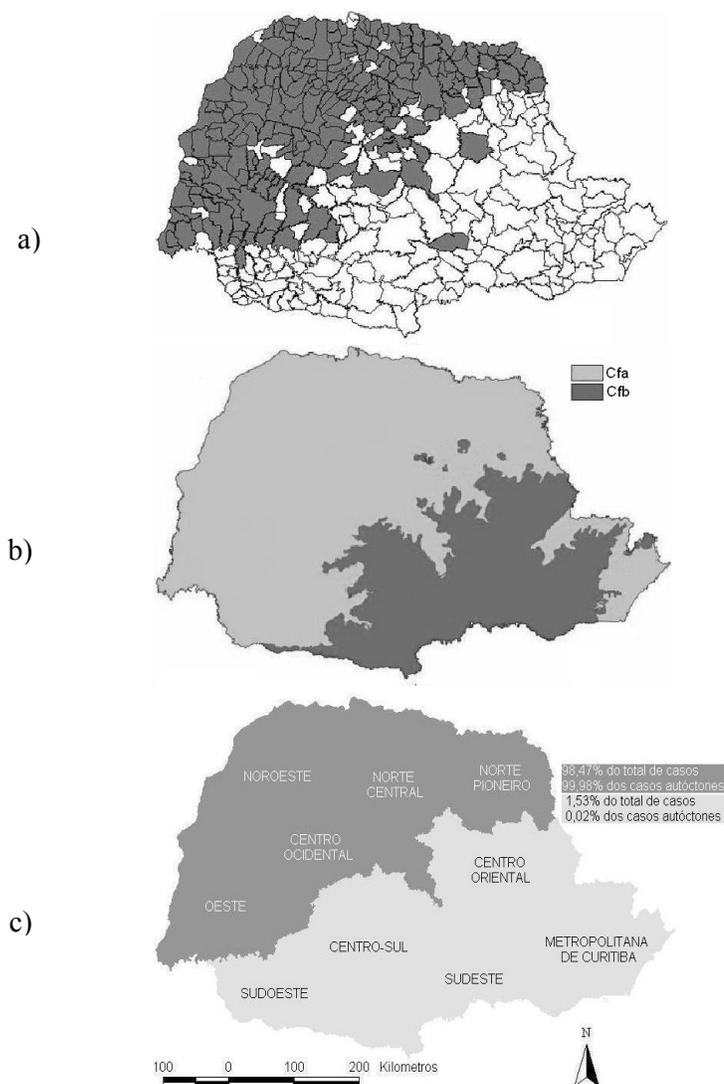


Figura 6. a) Municípios infestados pelo *Aedes aegypti* por cinco anos ou mais (em escuro), no período de 1995 a 2005 (SESA/PR); b) Classificação climática do Estado do Paraná, segundo Köppen, onde Cfa- clima subtropical, com verões quentes e com chuvas abundantes; e Cfb - clima temperado, com verões mais frescos (Adaptado de IAPAR 2000); c) Distribuição dos casos autóctones e importados por área.

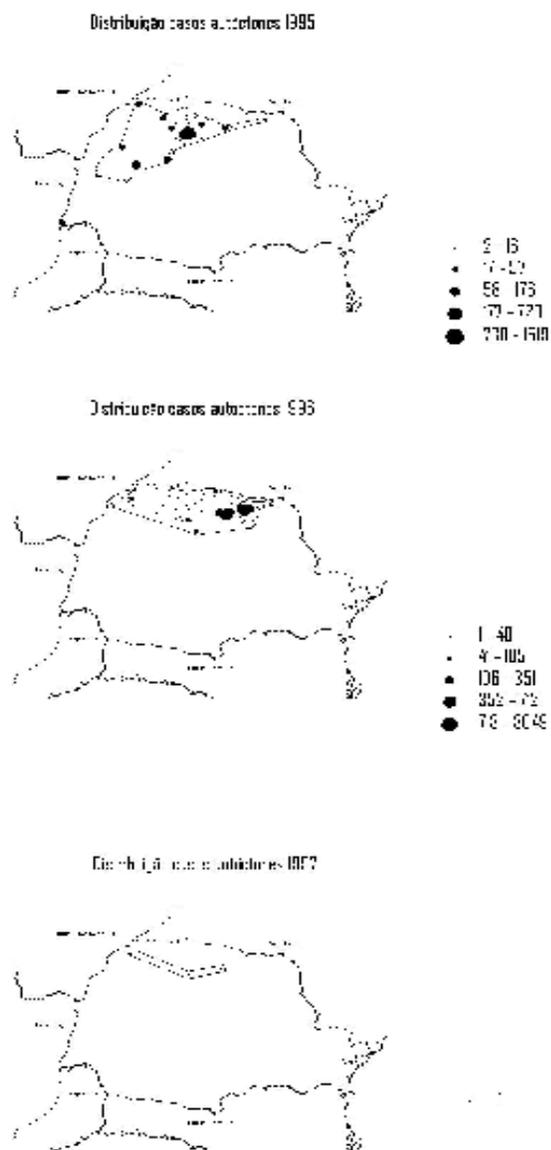


Figura 7. Dispersão dos casos autóctonos da dengue no Estado do Paraná, Brasil, período de 1995 – 1997 (Adaptado dos dados da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA/PR)).

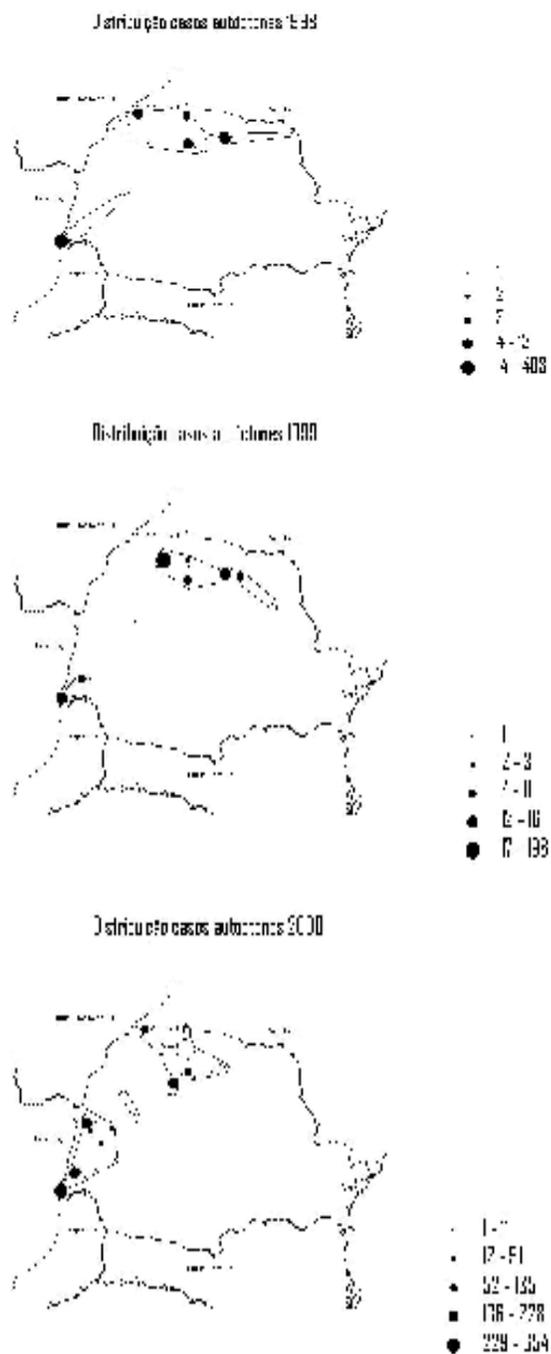


Figura 8. Dispersão dos casos autóctones da dengue no Estado do Paraná, Brasil, período de 1999- 2000 (Adaptado dos dados da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA/PR)).

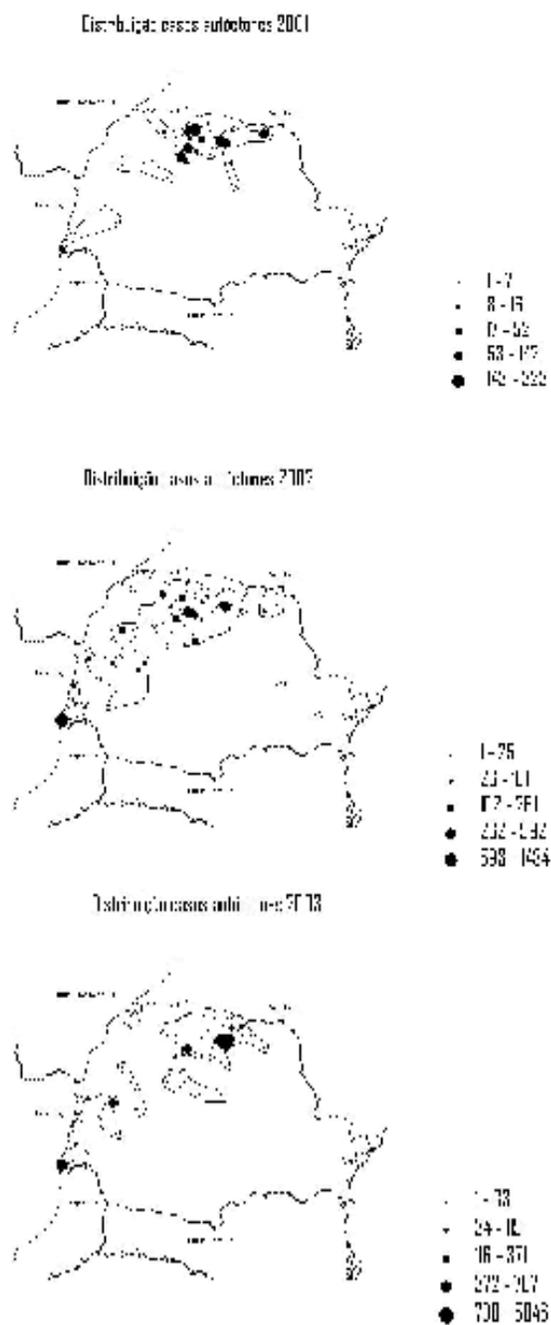


Figura 9. Dispersão dos casos autóctonos da dengue no Estado do Paraná, Brasil, período de 2001- 2003 (Adaptado dos dados da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA/PR)).

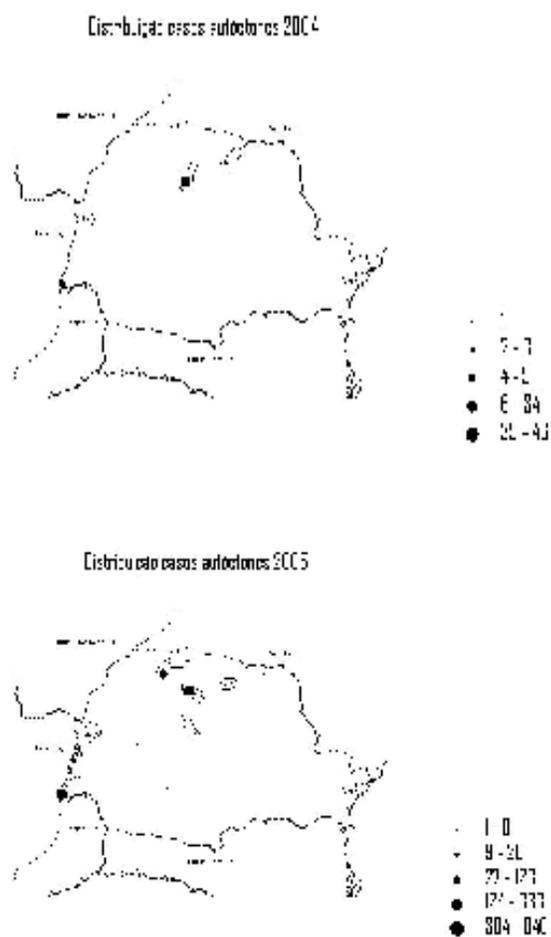


Figura 10. Dispersão dos casos autóctonos da dengue no Estado do Paraná, Brasil, período de 2004-2005 (Adaptado dos dados da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA/PR)).

2.6. DISCUSSÃO

A análise histórica da dengue no Estado do Paraná mostra grande variabilidade na ocorrência dos casos, tanto temporal quanto espacialmente. A ocorrência da dengue em ondas epidêmicas (oscilações dos casos da dengue) é fato bem conhecido em diversas outras regiões afetadas pela virose e pode caracterizar a endemização da mesma (Mondini *et al.* 2005), com eventuais explosões epidêmicas localizadas nas áreas de distribuição do vetor.

A distribuição geográfica da dengue no Estado permite inferir existência de pontos de concentração dos casos que merecem atenção diferenciada por parte dos órgãos de vigilância. Principalmente, nos municípios com população pequena que circundam estes núcleos, onde a incidência é alta. As cidades de Londrina, Maringá e Foz do Iguaçu, são localidades que já apresentaram epidemias no período considerado e que têm grande relevância em suas características de micro e mesorregiões, podendo atuar como pólos para disseminação do vírus da doença. Estas localidades possuem em comum o fato de serem centros urbanos com grandes densidades populacionais, Londrina é a segunda maior cidade do Paraná, com 450000 habitantes, 97% vivendo na zona urbana; Maringá é o terceiro maior município do Estado, com cerca de 290 000 habitantes, mais de 98% na zona urbana; e Foz do Iguaçu é a quinta maior cidade do Paraná, com cerca de 260 000 habitantes, mais de 99% ocupando a zona urbana (IBGE 2006). No entanto, pode-se afirmar que em Curitiba não houve relação entre alta densidade urbana e casos da dengue mesmo sendo o município mais populoso do Estado, apenas apresentando 253 casos da dengue, no intervalo de tempo estudado e apenas dois casos autóctones em 2002 (SESA/PR).

Existem, portanto, outros fatores, além do tamanho da população, que determinam a distribuição da dengue no Paraná. Neste caso, pode-se afirmar que a característica sazonal desta área Sul do Estado têm funcionado, até agora, como uma barreira climática. Sendo que a intensidade do inverno não permite a presença contínua e uniforme do vetor como nas outras regiões do norte do estado (Capítulo II, flutuação da oviposição).

Na região Norte, onde estão inseridas as mesorregiões Oeste, Centro-oeste, Noroeste, Norte-central e Norte pioneiro, a situação é outra. Nesta área é improvável que novas epidemias sejam evitadas nos próximos anos devido às condições climáticas menos rigorosas, viabilizando a atividade do vetor mesmo na estação de inverno; desta forma, atividades de vigilância entomológica nesta área devem ser intensivas em relação às outras do estado.

O município de Foz do Iguaçu merece vigilância especial, por se localizar na tríplice fronteira, entre o Brasil, o Paraguai e a Argentina. Um programa de controle da dengue na região somente tem significado se acompanhado de cooperação entre os três países, com o objetivo de detectar a circulação do vírus, dispersão do vetor e o surgimento de resistência química aos métodos de controle do mosquito.

A outra região de importância epidemiológica é aquela formada pelas mesorregiões Oeste, Noroeste, Centro Ocidental, Norte Central e Norte Pioneiro, onde diversas cidades além das já citadas apresentaram casos autóctones, e que estão na sua maioria infestadas pelo *Aedes aegypti*. As evidências observadas indicam que os surtos podem ter início em outros lugares diferentes aos de maior importância econômica e turística, como em 2007 para Ubatuba.

Uma região de menor relevância epidemiológica estaria formada pelas mesorregiões Sudoeste, Centro-Sul, Sudeste, Centro Oriental e Metropolitana de

Curitiba, que apresentaram, até aqui, um pequeno número de casos autóctones e que possuem distribuição restrita do *Aedes aegypti*. A vigilância nessas mesorregiões deve buscar principalmente o rápido diagnóstico e detecção por meio de seguimento epidemiológico dos casos importados, somado à contínua vigilância entomológica, para que se possa diminuir significativamente as populações do mosquito.

A distribuição desigual da dengue nas duas áreas é naturalmente explicada pela distribuição do mosquito *A. aegypti* no Paraná. Características climáticas, como temperatura, pluviosidade e umidade podem explicar a presença restrita do mosquito, já que diversos estudos têm demonstrado que a presença do *A. aegypti* é favorecida por temperaturas com média de 20°C e por precipitações pluviométricas abundantes (Kettle *et al.* 1995).

A malha viária pode ser um meio de disseminação do vetor da dengue, através do transporte acidental tanto do ovo como de adultos do mosquito. Assim, a determinação das principais vias terrestres dentro do Estado do Paraná compõe um dado importante para a epidemiologia da dengue. As rotas tidas como potencialmente mais vulneráveis para circulação do arbovírus e o vetor devem receber atenção prioritária, na tentativa de restringir a área de distribuição de ambos, prevenindo o aumento da área de ocorrência, tanto do *A. aegypti* como da dengue.

A análise da correlação entre os casos de dengue nas áreas de fronteira do Estado do Paraná indica que, possivelmente, a circulação do arbovírus no Paraná seja influenciada pelas áreas de fronteira nacional, com o Estado de Mato Grosso, e internacional com o Paraguai. A fronteira com São Paulo deve ter se como área de vigilância ativa, esta pode ser uma porta de entrada da doença, embora menor que as anteriores.

A utilização de ferramentas adequadas para o gerenciamento de informações e o correto e contínuo monitoramento das populações de adultos e imaturos do vetor junto com registro de casos da doença, associados ao sistema de informação geográfica (Morrison *et al.* 1998, Rosa-Freitas *et al.* 2003) pode fornecer elementos para direcionar os esforços de vigilância e o controle do *Aedes aegypti*, desde que haja intenso intercâmbio de informações entre as áreas afetadas.

É importante salientar que muitas infecções pelo vírus da dengue são assintomáticas e muitos casos não são notificados aos órgãos de saúde, o que pode subestimar os dados, ainda que dificilmente mude os padrões observados. Outros fatores sócio-ambientais podem ter importância na avaliação da incidência da dengue em uma determinada região, como o nível de conhecimento e conscientização ambiental da população. É fundamental que novos estudos busquem caracterizar as particularidades sócio-econômicas que podem atuar em cada área, e influenciando o quadro observado (Chen *et al.* 1996; Gubler 1998; Texeira *et al.* 2002).

Não existe vacina contra o vírus da dengue, e o combate a essa doença baseia-se unicamente no controle de *A. aegypti*, o que requer esforços de vigilância entomológica e educação ambiental junto à população, para que a mesma colabore na diminuição de criadouros do mosquito (Tauil 2002). Esses esforços devem cobrir principalmente a região norte do Estado, incluindo os municípios que circundam as cidades com maior número de casos da doença, que, como observado, apresentaram-se como os de maior incidência. O impacto da dengue sobre as comunidades menores podem apresentar-se como um risco potencial maior para disseminação a outras áreas. Municípios menores normalmente não são dotados de toda a infra-estrutura necessária para oferecer resposta aos problemas de Saúde

Pública à comunidade, principalmente no diagnóstico precoce do contágio do vírus e pessoal suficiente para cobrir em grande escala a vigilância entomológica.

Esse estudo permitiu observar que o padrão de ocorrência da dengue no Estado do Paraná, esta na região Norte, Centro ocidental e Oeste e reconhece a possível endemização da virose no Estado.

2.7 Conclusões

Existe um padrão de dispersão dos casos da dengue no estado fortemente relacionado com Mato Grosso do Sul, Paraguai, seguido de São Paulo e sem relação com Argentina.

As cidades de maior incidência não são as de maior número de casos.

O número de casos e a incidência da dengue apresentam taxas de incremento, que indicam uma tendência crescente.

Não foi evidenciada relação entre a resistência ao temefós e os casos da dengue.

AGRADEDIMENTOS

À Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, pela disponibilização dos dados referentes à ocorrência da dengue no Estado.

2.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arc View GIS* 1999. *Versão 3.2a* [Software]. New York (NY): Environmental Systems Research Institute.
- Câmara, F.P.; Theophilo, R.LG.; Santos, G. T.; Pereira, S.R.F.G.; Câmara, D.C.P & Matos, R.R.C. 2007. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **40**: 192-196.
- Chen, W.J.; Chen, S.L.; Chen, L.J.; Chen, C.C.; King, C.C & Harn, M.R. 1996. Silent transmission of dengue virus en Southern Taiwan. **American Journal of Tropical Medicine And Hygiene** **55**:12-6.
- Fundação Nacional de Saúde - FUNASA. 2001. Programa Nacional de Controle da Dengue. Brasília: Ministério da Saúde.
- Fundação Nacional de Saúde - FUNASA. 2002. Dengue - Instruções para pessoal de combate ao vetor: *Manual de normas técnicas*. 3ª. Edição. Brasília: Ministério da Saúde; 2001.
- Gubler, D.J. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews** **11**: 480-496.
- Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR. Cartas Climáticas do Paraná. 2002. Disponível em:
http://200.201.27.14/Site/Sma/Cartas_Climaticas/Cartas_Climaticas.htm.
Acessado em 24 de junho de 2005.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. 2006. Censo Demográfico 2006. Rio de Janeiro.
- Kettle, D.S. 1995. *Medical and Veterinary Entomology*. 2ª. Edição. London: CAB International.

- Maack R. 2002. Geografia física do Estado do Paraná. 3ª Edição. Curitiba: Imprensa Oficial do Paraná.
- Mondini A.; Neto, F.C.; Gallo, M.Y.S & Lopes JCC. 2005. Spatial analysis of dengue transmission in a medium-sized city in Brazil. **Revista de Saúde Pública** **39**: 444-451.
- Morrison, A.C.; Getis. A.; Santiago, M.; Rigau-Perez, J.G.; Reiter, P. 1998. Exploratory space-time analysis of reported dengue cases during an outbreak in Florida, Puerto Rico, 1991-1992. **American Journal of Tropical Medicine And Hygiene** **58**: 287–298.
- Ministério da Saúde – Serviço de Vigilância a Saúde – SVS. 2006. Situação epidemiológica da dengue até dezembro de 2006. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_13.pdf. Acessado em 24 novembro de 2007.
- Ministério da Saúde – Secretaria de vigilância em Saúde (SVS) 2007. Balanço da dengue Janeiro a Julho 2007 no Brasil. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/balanco_dengue_jan_jul_2007.pdf. Acessado em 24 novembro de 2007.
- Nogueira, R.M.; Miagostovich, M.P & Lampe, E. 1990. Isolation of dengue type 2 in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **85**:253.
- Nogueira, R.M.R.; Miagostovich, M.P.; Schatzmayr, H.G.; Santos, F.B.; Araújo, E.S.M.; Filippis A.M.B, *et al.* 1999. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **94**: 297-304.
- Nogueira, R.M.R.; Miagostovich, M.P.; Cunha, R.V.; Filippis, A.M.B.; Pereira, M.A.S & Schatzmayr, H.G. 2001. Dengue vírus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **96**: 925-926.

Organização Pan-americana da Saúde. 2007. Dengue 1995-2007. Disponível. <http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/cd/dengue.htm>. Acessado em 12 de outubro de 2007.

Rosa-Freiras, M.G.; Tsouris, P.; Sibajev, A.; Weimann, E.T.S.; Marques, A.U.; Ferreira, R.L, *et al.* 2003. Exploratory temporal and spatial distribution analysis of dengue notifications in Boa Vista, Roraima, Brazilian Amazon, 1999-2001. *Dengue Bulletin*; 27:63-80.

Secretaria de Saúde do Estado do Paraná. *Boletim Epidemiológico* 2003, 19: 3-4.

Serviço de Vigilância a Saúde - SVS. 2004. Dengue – *Boletim da Semana 34/2004*. Disponível em [URL:http://dtr2001.saude.gov.br/dengue/historico/Boletim_dengue_37_2004.pdf](http://dtr2001.saude.gov.br/dengue/historico/Boletim_dengue_37_2004.pdf). Acessado em 13 de abril de 2005.

Siqueira, J.B.; Martelli, C.M.T.; Coelho, G.E.; Simplício, A.C.R.; Hatch, D. 2005. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil, 1981-2002. **Emerging Infectious Diseases** 11: 48-53.

Tauil, P.L. 2002. Aspectos críticos do controle da dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública** 18: 867-871.

Teixeira, M.G.; Costa, M.C.N.; Guerra, Z.; Barreto, M.L. 2002. Dengue in Brazil: Situation-2001 and trends. *WHO Dengue Bulletin* 2002; 26:70-76

Teixeira, M.G.; Barreto, M.L.; Costa, M.C.N.; Ferreira, L.D.A.; Vasconcelos, P.F.C.; Cairncross, S. 2002. Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban área. *Trop Med Int Health*. 7:757-62.

3. CAPITULO II

Avaliação da resistência das populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) ao inseticida organofosforado temefós e dinâmica de oviposição de *Aedes* spp. nas diferentes estações do ano, no Estado do Paraná, Brasil

3.1. ABSTRACT

Evaluation of the resistance of populations of *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) to the organophosphate insecticide temephos and dynamics of oviposition of *Aedes* spp. in the different seasons of the year, in the state of Paraná, Brazil. The levels of susceptibility to the insecticide temephos were evaluated in *Aedes aegypti* specimens collected in egg traps set up in different municipalities of Paraná State. Two diagnostic concentrations (DC) of temephos were used, one determined through previous bioassays (DC1=0.0060 mg/L calibrated using Rockefeller (CDC reference strain)) and the other (DC2 = 0.0120 mg/L) recommended by the World Health Organization. DC1 pointed *A. aegypti* populations of Foz do Iguaçu, Paranavaí, Maringá, Ibiporã, Jacarezinho and Cambé with incipient alteration in susceptibility. DC2 indicated that only Cambé populations could be considered susceptible and the remaining as moderately resistant. A series of traps was also set in order to verify the annual oviposition activity, being significantly low in the two selected municipalities (Jacarezinho and Maringá) during winter ($F = 4.48$, $P = 0.014$). It is concluded that all vector populations analyzed should be strictly considered as resistant, even at low levels, and the dynamics of oviposition of *Aedes* spp is present throughout the year with a reduction of oviposition rates in winter.

Key words. Chemical control, dengue, chemical resistance, susceptibility, vector.

3.2. RESUMO

Avaliação da resistência das populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) ao inseticida organofosforado temefós e dinâmica de oviposição de *Aedes* spp. nas diferentes estações do ano, no estado do Paraná, Brasil. Os níveis de susceptibilidade ao inseticida temefós foram avaliados em indivíduos de *Aedes aegypti* coletados em armadilhas de oviposição instaladas em diferentes municípios do Estado do Paraná. Utilizaram-se duas concentrações-diagnóstico (CD) de temefós, uma determinada através de bioensaios prévios (CD1=0.0060 mg/L calibrada utilizando colônia Rockefeller (CDC cepa de referência)) e outra (CD2 = 0.0120 mg/L) sugerida pela Organização Mundial da Saúde. A CD1 acusou como resistentes as populações de *A. aegypti* de Foz do Iguaçu, Paranavaí, Maringá, Ibiporã, Jacarezinho e Cambé com alteração incipiente da susceptibilidade. A CD2 indicou que apenas a de Cambé poderia considerar-se como susceptível e as demais com alterações incipientes da susceptibilidade. Uma bateria de armadilhas também foi instalada para verificar a atividade anual de oviposição, observando-se nos dois municípios selecionados (Jacarezinho e Maringá) que foi significativamente reduzida no inverno ($F = 4.48$, $P = 0.014$). Conclui-se que todas as populações do vetor analisadas devem-se considerar estritamente como resistentes, embora a níveis baixos, e a dinâmica de oviposição de *Aedes* spp. está presente em todo o ano e na estação de inverno teve redução dos índices de oviposição.

Palavras-chave. Controle químico, dengue, resistência química, susceptibilidade, vetor.

3.3. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde estima que mais de 80 milhões de pessoas são infectadas anualmente no mundo com o vírus da dengue; destes aproximadamente 550 mil são hospitalizados e cerca de 20 mil morrem como consequência da doença (Funasa 2002). Dentro desta problemática, o Brasil responde por uma parcela grande dos casos desta doença, como consequência das dimensões continentais, a diversidade de climas e condições sócio-ambientais que dificultam a execução de ações realmente efetivas no controle do vetor *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae).

No Brasil, as principais cidades atingidas com a dengue estão localizadas na região Nordeste, compreendida pelos estados de Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia com 48,3% do total dos casos. Região Sudeste, com Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo com 37,2%. Centro-Oeste com Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal com 7,6%. Região Norte com Acre, Amazonas, Roraima, Rondônia, Pará, Amapá e Tocantins com 5,7% e a Região Sul com Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul com 1,2 % dos casos. A maioria das notificações concentram-se nos meses mais quentes do ano, distribuindo-se principalmente em dois períodos do primeiro semestre, assim: Região Sudeste, Centro-Oeste e Sul no primeiro trimestre do ano e na Nordeste no segundo trimestre, o que manifesta uma sazonalidade marcada (Câmara *et al.* 2007).

No país, várias estratégias destinam-se ao controle do aumento da incidência da dengue, que vão desde programas de manejo ambiental integrado e educacional da comunidade, até o controle focal do vetor com a utilização de produtos químicos e biológicos. No entanto, o principal método aplicado para controle populacional dos

estágios larvais de *Aedes aegypti* é à base do organofosforado temefós, com um histórico de aplicações desde 1967 (Ministério da Saúde 1968).

O “status” de susceptibilidade aos inseticidas é avaliado periodicamente em populações larvais de *A. aegypti* como indicado pelo Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) e o a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *A. aegypti* a inseticidas (MoReNAa) (WHO 1992, Funasa 1999, Braga & Valle 2007). Como resultado do monitoramento a este produto, diferentes trabalhos determinaram a susceptibilidade e em alguns casos, alertando para o aparecimento de indivíduos resistentes, como reportado para os seguintes Estados do Brasil (Macoris *et al.* 1999; Campos & Andrade 2001; Macoris *et al.* 2003; Lima *et al.* 2003; Braga *et al.* 2004; Carvalho *et al.* 2004; Duque *et al.* 2004; Lima *et al.* 2006; Beserra *et al.* 2007).

Como preconizado no MoReNAa, os testes para detectar perda de susceptibilidade ao temefós devem ser efetuados priorizando pontos estratégicos, principalmente em municípios sentinela onde existe persistência histórica desta doença. Na região Sul, o Paraná é o único estado com casos autóctones notificados, no qual três municípios apresentam histórico contínuo de ocorrência de casos: Foz do Iguaçu, Maringá e Londrina desde 1995 (Ver dados Capítulo I). No entanto, não existem registros históricos publicados dos níveis de susceptibilidade.

Como consequência do aumento progressivo da incidência da dengue em novas áreas, e a onda epidêmica enfrentada no biênio 2002, 2003 e 2007 no Paraná, pode ser levantada a possibilidade que este aumento este ligado à perda da susceptibilidade das populações deste vetor ao temefós nas localidades onde o vetor está presente.

Em decorrência de não existir uma fonte histórica da susceptibilidade ao temefós, como também um desconhecimento dos elementos biológicos, genéticos e operacionais que contribuem na evolução da resistência nesta região (Georghiou & Taylor 1986, Bisset 2002), são necessários estudos que estabeleçam uma linha base do “status” de resistência atual no Estado, para futuros estudos mais aprofundados das inter-relações biológicas da dinâmica de resistência. Para isto, é necessário ampliar a amostragem a mais pontos estratégicos como localidades próximas às fronteiras nacional e internacional, assim como o próprio número de municípios. Dentro destes, incluídos pólos geradores de alto fluxo comercial e turístico que conectam o Paraná com Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraguai e Argentina. Desta forma, detectar-se-ia o desenvolvimento da resistência de forma precoce, em áreas com diferentes riscos de ocorrência da dengue, permitindo a tomada de decisões de forma efetiva e econômica nas ações de controle.

O objetivo da investigação foi avaliar a susceptibilidade ao temefós, em populações de *Aedes aegypti* no Estado do Paraná e o fluxo de oviposição em diferentes períodos estacionais.

3.4. MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material. Em convênio com a Secretaria Estadual de Saúde do Paraná, foram instaladas armadilhas para oviposição (ovitrampas) com volume de 500 mL de solução de feno a 10% (Funasa 2002). Em cada uma foi incluída uma paleta de eucatex para oviposição das fêmeas de *A. aegypti* em duas baterias: a primeira instalada num período reconhecido de alta densidade de ovos (verão 2004-2005) para realizar os testes de suscetibilidade e a segunda em 12 meses para os municípios de Maringá e Jacarezinho, considerados locais de alta e baixa infestação

pelo *Aedes aegypti*, respectivamente, sendo estes dois municípios selecionados apenas para observar a flutuação de oviposição em localidades com diferente histórico de casos de dengue (Tabela I). As ovitrampas foram colocadas aleatoriamente nos peridomicílios da área urbana dos seguintes municípios do Paraná: Curitiba, Paranaguá, Foz do Iguaçu, Cascavel, Paranavaí, Maringá, Ibiporã, Cambé, Santa Mariana, Jacarezinho e Guaíra num período de 5 dias (Figura 1, 2). No geral foram distribuídas 25 ovitrampas por local, com exceção de Paranavaí com 50 e Guairá com 30 armadilhas (SESA 2006). É importante esclarecer que na instalação destas armadilhas não foi seguido estritamente o critério de número de casas (vivendas) por armadilha como indica o PNCD e não se diferenciou os ovos em quanto à espécie da segunda bateria de armadilhas instaladas, apenas se avalio a atividade de oviposição para as duas espécies.

Tabela I. Localidades e períodos de instalação das armadilhas de oviposição para *Aedes aegypti*.

Município Coordenadas geográficas.	Período de instalação	População aproximada de habitantes*	N° de armadilhas instaladas
Paranaguá 25° 31' 12" S - 48° 30' 32" O	24/I/2005 - 29/I/2005	147.934	25
Curitiba 25° 25' 47" S 49° 16' 19" O	24/I/2005 - 29/I/2005	1.797.408	25
Cascavel 24° 57' 21" S 53° 27' 18" O	31/I/2005 - 04/II/2005	294.385	25
Santa Mariana 23° 09' 03" S 50° 31' 08" O	24/I/2005 - 29/I/2005	12.553	25
Foz do Iguaçu 25° 32' 52" S 54° 35' 16" O	18/II/2005 - 23/II/2005	309.113	25
Paranavaí 23° 04' 22" S 52° 27' 54" O	02/V/2005 - 06/V/2005	79.222	50
Maringá ** 23° 25' 30" S 51° 56' 20" O	21/II/2005 - 26/II/2005	329.800	25
Guairá 24° 04' 48" S 54° 15' 21" O	18/VII/2005 - 22/VII/2005	27.668	30
Cambe 23° 16' 33" S 51° 16' 40" O	07/XII/2005 - 11/XII/2005	98.788	25
Cambe	15/XII/2006 - 19/XII/2006		25
Ibiporã 23° 16' 08" S 51° 02' 52" O	15/XII/2006 - 19/XII/2006	47.316	25
Ibiporã	15/XII/2006 - 19/XII/2006		25
Jacarezinho** 23° 09' 39" S 49° 58' 08" O	18/IV/2006 - 22/IV/2006	38.714	25

* IBGE 2006, ** Municípios onde foram instaladas armadilhas num período de um ano (período abril 2005- março 2006).



Figura 1. a) Equipe da Secretaria do Estado da Saúde do Paraná, b) Preparação das armadilhas de oviposição e c) Armadilha instalada. Foto tirada em 24/11/2005 na Rodoferroviária, Curitiba PR.

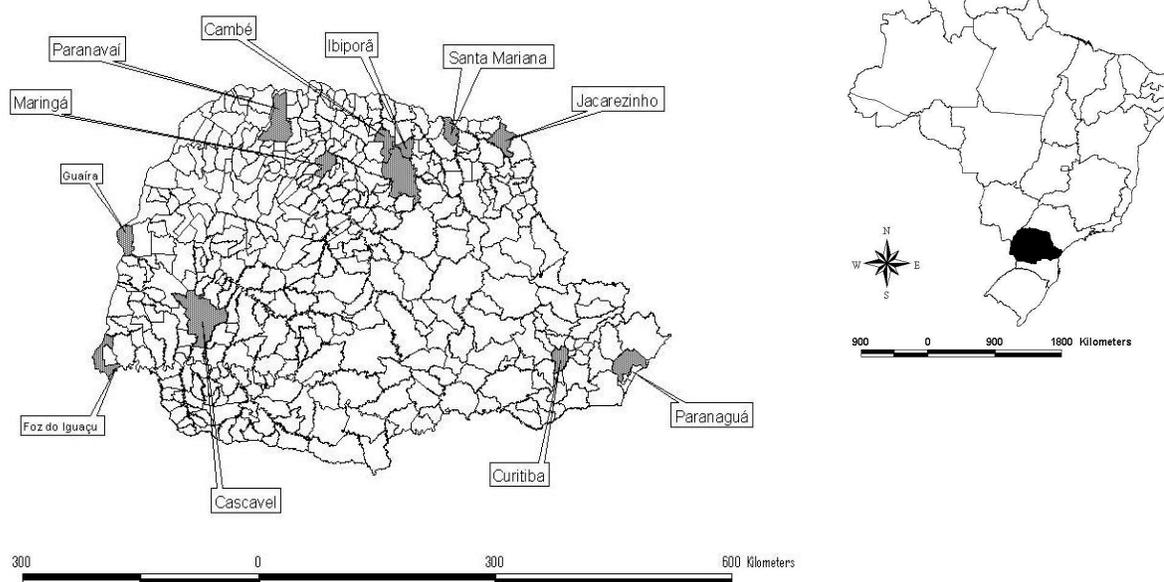


Figura 2. Mapa do Estado do Paraná, destacando os municípios onde foram instaladas as armadilhas de oviposição para coleta de ovos de *Aedes aegypti*.

As paletas das ovitrampas detectadas como positivas foram analisadas no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da Universidade Federal do Paraná (Departamento de Zoologia). Posteriormente os ovos foram quantificados sob microscópio estereoscópico, colocando as palhetas individualmente, em copos com capacidade de 770 mL de água com ração para gatos Purina® Cat Chow® triturada aproximadamente 0.36 g/ copo para induzir a eclosão. As paletas foram retiradas 24 horas após a imersão, devido ao decréscimo da qualidade da água quando estas são mantidas nos copos por longos períodos. As larvas foram mantidas nestes copos adicionando uma quantidade aproximada de um 1g de ração diária até o estágio de pupa e nesta fase foram colocadas em gaiolas para separação dos adultos, identificados quanto ao sexo e espécie, para implantação de colônias para obtenção das gerações F1 ou F2 de *Aedes aegypti*. Os indivíduos de *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894 que resultaram da eclosão das paletas positivas, não foram utilizados para análise de susceptibilidade a inseticidas.

Bioensaios. O inseticida usado foi o temefós grau técnico 90%” lote 002/2005 fabricado por laboratórios “Fersol Mairinque”, São Paulo. A calibração do produto químico foi realizada com a linhagem susceptível *A. aegypti* Rockefeller. Os bioensaios seguiram o modelo recomendado pela Organização Mundial da Saúde (1981) e o programa para monitoramento no Brasil (MoReNAa e PNCD). Foram utilizadas duas concentrações diagnósticas (CD) para detectar qualitativamente presença de indivíduos resistentes em relação à colônia susceptível; a primeira estabelecida nas condições do laboratório que foi 0.0060 mg/L, correspondendo a duas vezes a CL_{99} (0.0030 mg/L) da colônia Rockefeller, é a 0.0120 mg/L recomendada pela OMS (WHO 1981, 1992; Lima *et al.* 2003). Esta última foi

utilizada como um parâmetro a mais de comparação para determinar se esta CD pode ser aplicada para o Paraná.

Para analisar quantitativamente as populações do mosquito ao inseticida foram utilizadas oito concentrações do inseticida, incluindo a diagnóstica (Anexo 1). Depois de estabelecidas se utilizaram por concentração 100 larvas de terceiro e quarto estágio, divididas em quatro réplicas, além do controle, com álcool (99%). Os experimentos foram repetidos quatro vezes em dias diferentes e o desenho experimental seguiu as indicações de Robertson & Preisler (1992). Todos os testes foram realizados em paralelo com a colônia Rockefeller e tiveram condições controladas de temperatura ($25^{\circ} \pm 1$), umidade ($70\% \pm 10$) e fotoperíodo (12:12) (Figuras 3-4).



Indução à eclosão



Estabelecimento das colônias



Produção de ovos para os testes



Larvas sincronizadas de terceiro e quarto instar



Separação das larvas para os testes



Adição do álcool e temefós



Condições controladas

Figura 3. Etapas da preparação dos testes de susceptibilidade em laboratório de populações de *Aedes aegypti* de dos municípios amostrados do Estado do Paraná.

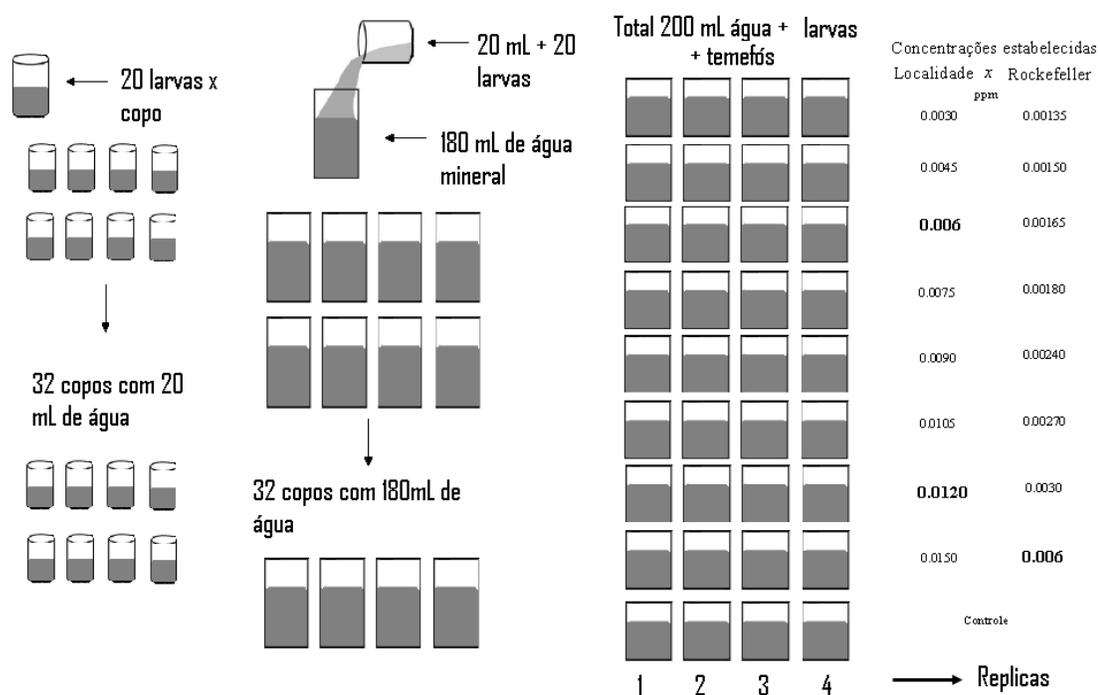


Figura 4. Modelo para elaboração dos testes de susceptibilidade ao inseticida temefós (modelo sugerido para preparar as diluições do inseticida, anexo 1).

Critérios e avaliação estatística dos bioensaios

Foram seguidos vários critérios para detectar alterações da susceptibilidade das populações analisadas; resposta de mortalidade á concentração diagnóstico superiores a 98% se considerou como susceptível, entre 98–80% sugerem insipiente alteração do status de resistência e menores de 80% indicam populações em que a resistência está presente (Davidson & Zahar 1973); a razão de resistência (RR) como indicador quantitativo, foi calculada comparando as concentrações letais (RR₅₀ e RR₉₅) 50 e 95 % de mortalidade (CL₅₀, CL₉₅) das localidades com as da colônia Rockefeller. As CL₅₀ e CL₉₅ foram da seguinte forma: CL₅₀ da localidade/ CL₅₀ Rockefeller. Os níveis de resistência definem-se como menor de 5 vezes considerando status baixo, entre 5 e 10 considera-se médio e acima de 10, alto (Mazzari & Georghiou 1995). O programa Probit GW-Basic (Finney 1971) foi utilizado para determinação das concentrações letais CL₅₀, 95, teste χ^2 , inclinação e intervalos de confiança.

Critérios e avaliação estatística das armadilhas instaladas no percurso de um ano

Para detectar diferenças estatísticas na oviposição e no número de armadilhas positivas instaladas entre os municípios de Maringá e Jacarezinho no período de um ano, utilizou-se análise de variância (ANOVA). Quando detectadas diferenças significativas foi aplicado o teste de Tukey HSD (Honestly significant difference).

3.5. RESULTADOS

Armadilhas de oviposição instaladas para os testes de susceptibilidade

Das 355 armadilhas de oviposição instaladas no estado do Paraná , 160 foram positivas para imaturos, com um total de 6298 ovos. O município com maior índice de positividade da ovitrampa foi Santa Mariana e o menor, Guaíra. Na indução dos ovos a eclosão das larvas em condições de laboratório, as espécies encontradas foram *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Tabela II).

Atividade de oviposição no período de um ano em Maringá e Jacarezinho

Maringá apresentou maior número de palhetas positivas e número de ovos (N° paletas = 119, N° ovos = 7831) que Jacarezinho (N° paletas = 113, N° ovos = 4528), sem diferenças estatísticas significativas para ovos e armadilhas positivas, respectivamente $F = 1.104$, $P = 0.304$ e $F = 0.03$, $P = 0.857$. No entanto, analisando estas mesmas variáveis em relação às estações do ano (primavera, verão, outono e inverno) detectaram-se diferenças significativas $F = 4.48$, $P = 0.014$ (Tabela III). O teste de “Tukey HSD” confirma que nos dois municípios a atividade de oviposição no inverno (junho, julho e agosto) foi reduzida, no entanto, foi registrada a presença de *Aedes* spp. ao longo de todo período de observação (Figura 5).

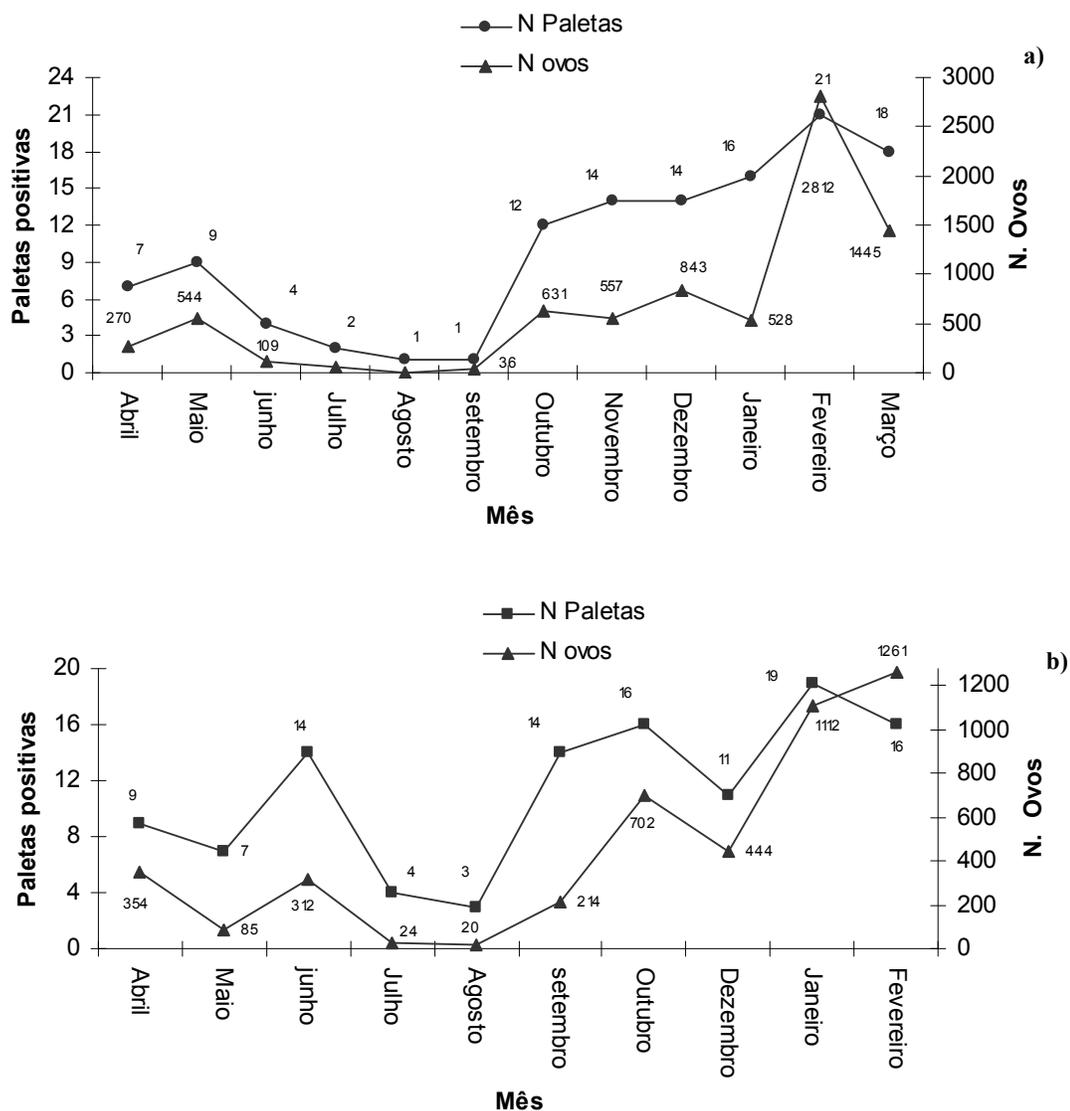


Figura 5. Número de paletas positivas para *Aedes* spp. e total de ovos nas armadilhas de oviposição de Maringá (a) e Jacarezinho (b) no período de abril de 2005 a março 2006. Em Jacarezinho não foram instaladas armadilhas em novembro por problemas operacionais.

Tabela II. Número de ovitrampas, Índice de positividade da ovitrampa (I.P.O) e espécies nos municípios do Estado do Paraná.

Localidade <i>paletas/localidade</i>	N palhetas +	Ovos (N)	Media	I.P.O	Espécie
Paranaguá	10	517 ± 14.7	51.7	40	<i>Ae. albopictus</i>
Curitiba	0	-	-	-	-
Cascavel	12	536 ± 19.3	47.7	48	Sem eclosão
Santa Mariana	23	946 ± 29.8	41.1	92	Sem eclosão
Foz do Iguaçu	14	777 ± 28.8	55.5	56	<i>Ae. aegypti</i>
Paranavaí **	14	399 ± 24.7	28.5	28	<i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>
Maringá	18	476 ± 15.6	26.4	72	<i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>
Guairá*	4	100 ± 19	25	16	Sem eclosão
Cambe	14	775 ± 49	55.3	56	<i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>
Cambe	14	277 ± 13.8	19.7	56	<i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>
Ibiporã	15	792 ± 50.6	52.8	60	Sem eclosão
Ibiporã	13	349 ± 25.6	26.8	52	<i>Ae. aegypti</i>
Jacarezinho	9	354 ± 26.7	39.3	36	<i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>

* = 30, **= 50 Paletas instaladas ±: Desvio médio, I.P.O: número de palhetas positivas x número total de palhetas /100.
Onde não houve eclosão foi a causa que algumas das armadilhas era adicionado temefós, as outras foi avisado para não colocar.

Bioensaios avaliando as concentrações diagnósticas e as razões de resistência

A análise das populações de *Aedes aegypti* dos municípios avaliados revelou que todos os municípios do Estado do Paraná avaliados com a concentração diagnóstica CD1 (0.0060 mg/L) acusaram que a ação da resistência esta presente e em desenvolvimento. Porém com a dose CD2 (0.0120 mg/L) recomendada pela OMS apenas Cambé foi considerado como susceptível, sendo que para os outros municípios, os dados apontaram modificações incipientes da susceptibilidade.

Em relação às concentrações diagnósticas utilizadas na avaliação da susceptibilidade, a CD1 e CD2 acusaram menor porcentagem de mortalidade em Maringá, e maior com as CD1 e CD2 em Cambé (Tabela IV). As razões de resistência de todos os municípios analisados RR_{50} e RR_{95} confirmam que as populações de Paranavaí, Maringá e Ibiporã apresentam resistência média e as demais, baixa resistência. Também, observo-se que o coeficiente angular de todas as localidades analisadas apresenta-se menor que quando comparado com a colônia susceptível (Rockefeller) o que confirma uma diferença na resposta ao inseticida. (Tabela V).

Tabela III. Atividade de oviposição de *Aedes* spp. nos municípios de Maringá e Jacarezinho no período de abril de 2005 a março 2006.

Localidade		Estação				Total
		Verão ^a	Outono ^a	Inverno ^b	Primavera ^a	
		Dez-Jan-Fev	Mar-Abr-Mai	Jun-Jul-Ago	Sep-Out-Nov	
Maringá*	Ovos	4183	2259	165	1224	7831
	Palhetas +	51	34	15	27	119
Jacarezinho*	Ovos	2817	439	356	926	4528
	Palhetas +	46	16	21	30	113

+ Armadilhas positivas coletadas; * sim diferenças significativas entre municípios; ^a não detectadas diferenças significativas entre as estações, ^b estação com diferenças significativas detectadas.

Tabela IV. Avaliação da mortalidade com as concentrações diagnósticas 0.0060 mg/L (calibrada com a cepa Rockefeller) e 0.0120 mg/L (recomenda da OMS) nas populações de *Aedes aegypti* em sete municípios do Estado do Paraná em comparação com a linhagem susceptível Rockefeller.

Município	% Mortalidade	
	0.0060 mg/L	0.0120 mg/L
Rockefeller	100	100
MC		
Foz do Iguaçu	67.5± 7.7	93.4±2.5
Paranavaí	58.1 ± 14	97.5±2.4
Maringá	57.8± 5.2	81.5±4.7
Ibiporã	68.75 ± 3.9	85.6±10
Cambé	81,56± 10	100
Jacarezinho	73.3 ± 7.5	97±3.1

± : Desvio Médio.

Tabela V. Geração utilizada nos testes (F), concentrações letais (mg/L), coeficiente angular e razão de resistência de *Aedes aegypti* em municípios do Estado de Paraná.

Município	F	CL ₅₀	CL ₉₅	CA	X ²	RR50	RR95
Rockefeller M.C		0,00173	0,00297				
		0,0016 – 0,0017	0,0027– 0,0032	7,00 ± 0,3	1,209	1	1
Foz do Iguaçu	F2/F3	0,00456	0,01187				
		0,0043 – 0,0047	0,01121-0,1267	3,96 ± 0,1	6,028	2,6	3,9
Paranavaí	F2	0,00560	0,01018				
		0,00544- 0,00576	0,0097-0,0106	6,33 ± 0,2	4,6	3,2	3,4
Maringá	F2	0,00564	0,02050				
		0,0052 – 0,0059	0,0183– 0,0235	2,93 ± 0,1	6,7	3,2	6,9
Ibiporã		0,00540	0,01972				
	F2	0,00514–0,00583	0,0179– 0,0220	2,96 ± 0,1	5,6	3,1	6,6
Cambe	F2	0,00400	0,00782				
		0,00385-0,00415	0,0074– 0,0083	5,6 ± 0,2	2,2	2,3	2,6
Jacarezinho	F2	0,00277	0,00912				
		0,0021 – 0,0032	0,0077– 0,0120	3,18 ± 0,4	0,477	1,6	3

3.6. DISCUSSÃO

Para análise das populações coletadas no Estado do Paraná, foram comparadas duas concentrações diagnósticas, a recomendada pela OMS e outra calibrada como indicado pela rede de laboratórios MoReNAa, para determinação da susceptibilidade de populações de *Aedes aegypti* no Brasil. A concentração diagnóstica (CD1) estabelecida a partir de bioensaios no laboratório com *A. aegypti* Rockefeller evidenciou que todas as localidades que foram comparadas com esta colônia se apresentaram menos susceptíveis, indicando a existência do processo de estabelecimento da resistência. No entanto, foram detectadas variações da intensidade de susceptibilidade da seguinte maneira; Foz do Iguaçu, Paranavaí, Maringá, Ibiporã e Jacarezinho como as mais resistentes e Cambé com modificação insipiente da susceptibilidade, segundo o critério de Davidson & Zahar (1973). O que implica que as populações de *A. aegypti* dos municípios amostrados estão sob pressão diferenciada de seleção, resultando em variados graus de suscetibilidade quando se comparam com uma linhagem totalmente susceptível (WHO 1992).

Em contraposição com a dose calibrada, a dose diagnóstica sugerida pela OMS foi menos rígida com os valores de mortalidade, acusando como com modificação insipiente da susceptibilidade as localidades de Foz do Iguaçu, Paranavaí, Maringá, Ibiporã, Jacarezinho, e apenas Cambé como susceptível. Isto confirma que a concentração diagnóstica calibrada, além de discriminar populações resistentes, tem a vantagem de avaliar rigorosamente o decréscimo da susceptibilidade (Macoris *et al.* 2005), especialmente em lugares onde não se conhece o histórico das aplicações dos inseticidas.

Segundo a aplicação do critério de Mazzari & Georghiou (1995), os valores das RR_{50} e RR_{95} apresentaram-se em níveis baixos quando comparados com os

valores detectados no Rio de Janeiro (Duque de Caxias, São Gonçalo e São João de Meriti) por Lima *et al.* (2003), também em Alagoas (Maceió e Arapiraca), Sergipe (Aracaju, Barra dos Coqueiros e Itabaiana) e Rio de Janeiro (Campos dos Goytacazes, Duque de Caxias, Niterói, Nova Iguaçu, São Gonçalo e São João de Meriti) por Braga *et al.* (2004), em Ceará (Fortaleza, Juazeiro do Norte e Crato) por Lima *et al.* (2006), na Paraíba (Boqueirão, Brejo dos Santos, Campina Grande, Itaporanga e Remígio) e sendo similares aos encontrados em alguns municípios de São Paulo (Campinas) por Campos & Andrade (2001) e Araçatuba, Barretos, Bauru, Campinas, Marília, Presidente Prudente, Pirituba, Ribeirão Preto, São José do Rio Preto e Santos (Macoris *et al.* 2003). A comparação com os resultados obtidos nesta análise indicam que a resistência é apenas incipiente para os municípios paranaenses analisados.

Igualmente, confirmo-se que os valores de RR_{50} RR_{95} do trabalho de Duque *et al.* (2004) em Curitiba, Paraná, são considerados baixos em relação aos encontrados neste estudo. As análises apontam, para o Paraná, a necessidade de revisão sistemática dos inseticidas empregados no controle das populações de *A. aegypti*. Embora o produto possa ser considerado como relativamente efetivo até o momento, sua utilização deve ser monitorada permanentemente e pode-se pensar desde já na possibilidade de um substituto, no sentido de alertar e evitar o comprometimento das ações de controle do vetor.

Em relação aos aspectos epidemiológicos na região Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), os números de casos da dengue notificados somam apenas 1,2% do total do Brasil; isto é uma consequência direta das características sazonais que influenciam a dinâmica do vetor, com redução natural da população do vetor devido a baixas temperaturas (Câmara *et al.* 2007). Estas reduções na

abundância de mosquitos nos períodos de frio intenso levam à redução das atividades de controle químico, com conseqüente diminuição na pressão de seleção, oposto ao observado em localidades de temperatura mais elevadas, onde normalmente são apresentados índices de resistência mais elevados.

Por outro lado, destacando as características subtropicais da área norte do Estado do Paraná, e a capacidade adaptativa do vetor, pode-se inferir que, índices de infestação similares aos de áreas onde o vetor persiste, implicariam na intensificação das aplicações de inseticida, pressionando, conseqüentemente os níveis de resistência.

Nas armadilhas instaladas em Maringá e Jacarezinho no período de abril de 2005 até março de 2006 a dinâmica de oviposição ocorreu praticamente sem interrupção, mesmo nos períodos de baixas temperaturas como as registradas normalmente na estação de inverno. Desta maneira indivíduos de *Aedes aegypti* ou *A. albopictus* que sobrevivem nas estações mais frias podem dar continuidade aos processos biológicos e genéticos que conferem a resistência, isto é algo que se deve pesquisar, para comprovar realmente se a sazonalidade influencia os níveis de resistência.

No futuro, o fator que pode contribuir na homogeneidade dos valores da resistência no Paraná em relação aos demais Estados do país, é o fluxo gênico entre populações, fatores hereditários ligados à dispersão e cruzamento entre populações como observado por Rawlins (1998). No caso do Paraná, pode ser que a similaridade de susceptibilidade com São Paulo seja explicada pela proximidade geográfica e pelos padrões genéticos de *A. aegypti* como observado por Paduan *et al.* (2006), embora não relacionados à resistência.

As populações de *A. aegypti* analisadas apresentam-se resistentes, embora a

níveis baixos, quando comparado com outros estados do Brasil. É necessário efetuar estudos sistemáticos que permitam entender se o padrão de resistência detectado é consequência de fatores internos operacionais ou fatores relacionados com a dinâmica e dispersão do vetor, como também se a coexistência com *A. albopictus* influencia nos padrões de susceptibilidade devido à provável competição ou mesmo alteração no padrão de densidade destes vetores ao longo dos períodos sazonais.

3.7. Conclusões

Todas as localidades que foram comparadas com a colônia “Rockefeller” se apresentaram menos susceptíveis, indicando o estabelecimento da resistência.

A concentração diagnóstica calibrada é mais rigorosa para detectar o decréscimo da susceptibilidade.

A dinâmica de oviposição ocorreu praticamente sem interrupção mesmo nos períodos de baixas temperaturas.

AGRADECIMENTOS

À Secretaria de Estado em Saúde do Estado do Paraná, às equipes dos núcleos de pesquisa em entomologia pelo envio do material para realização do presente trabalho. À pesquisadora Maria de Lourdes da Graça Macoris da Superintendência de controle de Endemias – SUCEN- Marília (SP) e aos doutores Denise Valle e José Bento Pereira Lima do Instituto de Biologia do Exército do “Instituto Oswaldo Cruz (RJ)” pela acessória dos bioensaios e pelo fornecimento do temefós.

3.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Braga, I.A & Valle, D. 2007. *Aedes aegypti*: vigiância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde** **16**: 113-118.
- Beserra, E.B.; Fernandes, C.R.M.; Queiroga, M.F.C & Castro, F.P.Jr. 2007. Resistência de populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefós na Paraíba. **Neotropical Entomology** **36**: 303-307.
- Braga, I.A.; Lima, J.B.P.; Soares, S.S & Valle, D. 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **99**: 199-203.
- Bisset, J. A. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. **Revista Cubana de Medicina Tropical** **54**: 202- 219.
- Câmara, P.F.; Theophilo, G.R.L.; Santos, T.G.; Pereira, G.S.R.F.; Câmara, P.D.C & Matos, R.R. 2007. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **40**: 192-196.
- Campos, J & Andrade, C.F.S. 2001. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticida químicos. **Revista de Saúde Pública** **35**: 232-236.
- Carvalho, M.S.L.; Caldas, E.D.; Degallier, N.; Vilarinhos, P.T.R.; Souza, L.C.K.; Yoshizawa, M.A.C.; Knox, M.B & Oliveira, C. 2004. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to the insecticide temephos in the Federal District, Brazil. **Revista de Saúde Pública** **38**: 623-629.
- Davidson, G & Zahar, D.A. 1973. The practical implications of resistance of malaria vectors to insecticides. **Bull World Health Organ** **49**: 475-483.

- Duque, J.E.L.; Martins, F.M.; Anjos, F.A.; Kuwabara, E.F & Navarro-Silva, M.A. 2004. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Publica. 38**: 842-843.
- Finney, D.J. 1971. **Probit Analysis**. Cambridg University Press, 3rd Edition.
- Funasa. <http://www.funasa.gov.br/epi/dengue/dengue0.htm#>. Acessado em 01/10/2003.
- Funasa 1999. Reunião técnica para discutir status de resistência de *Aedes aegypti* e definir estratégias a serem implantadas para monitoramento da resistência no Brasil. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasília.
- Funasa 2002. Programa Nacional de Controle da Dengue. Brasília: Ministério da Saúde.
- Georghiou, G. P & Taylor, C. E. 1986. **Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management**. Ed. National Research Council. National Academy Press, Washington DC. 157-169 pp.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. 2006. Censo Demográfico 2006. Rio de Janeiro.
- Lima, J.B.P.; Pereira da Cunha, M.; Silva-Jr, R.C.S.; Galardo, A.K.R.; Soares, S.S.; Braga, I.A.; Ramos, R.P & Valle, D. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine And Hygiene 68** :329-333.
- Lima, E.P.; Oliveira, A.M.F.; Lima, J.W.O.; Ramos, A.N.J.; Cavalcanti, L.P.G & Pontes, R.J.S. 2006. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 39**: 259-263.

- Macoris, M.L.G.; Andrighetti, M.T.M.; Nalon, K.C.R.; Garbeloto, V.C & Junior, A.L.C. 2005. Standardization of bioassays for monitoring resistance to insecticides in *Aedes aegypti*. **Dengue Bulletin 29**: 176-182.
- Macoris, M.L.G.; Andrighetti, M.T.; Takaku, L.; Glasser, C.M.; Garbeloto, V.C & Cirino, V.C.B. 1999. Alterações de resposta de Susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública 33**: 521-2.
- Macoris, M.L.G.; Andrighetti, M.T.; Takaku, L.; Glasser, C.M.; Garbeloto, V.C & Bracco, J.E. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to Organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 98**: 703-708.
- Mazzari, M.B & Georghio, G.P. 1995. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. **Journal of the American Mosquito Control Association 11**: 315-322.
- Ministério da Saúde 1968. Endemias Rurais. Métodos de trabalho adotados pelo DNERu, Departamento Nacional de Endemias Rurais.
- Ministério da Saúde / Serviço de Vigilância a Saúde - SVS. 2005. Dengue – Disponível em URL: http://dtr2001.saude.gov.br/dengue/historico/Boletim_dengue_37_2004.pdf. Acessado em 13 de abril de 2005.
- Paduan, K.S.; Araújo-Júnior, J.P & Ribolla, P.E.M. 2006. Genetic variability in geographical populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Brazil elucidated by molecular markers. **Genetics and Molecular Biology 29**: 391-395.
- Rawlins, S.C. 1998. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. **Pan Am J Public Health 4**: 243-251.
- Robertson, J.L & Preisler, H.K. 1992. **Pesticide bioassays with arthropods**. CDC Press. United States of America. 127 pp.
- SISFAD - SESA/PR. 2006. Sistema de Informação de Febre Amarela e Dengue. Ministério da Saúde, programa de computador utilizado pela FUNASA, em nível

- nacional, para processar dados obtidos nas atividades de campo desenvolvidas pelos Agentes de Saúde. SESA/PR – Secretaria de Estado da Saúde do Paraná.
- World Health Organization. 1992. Vector Resistance to pesticides. Fifteenth Report of The WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. *WHO Technical Report Series*. 818:1-62.
- World Health Organization. 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva. 1981. (WHO/VBC/81.807).

4. CAPITULO III

Abundância e agregação de ovos de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus e *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) em Municípios da Região Norte e Noroeste do Estado do Paraná, Brasil

4.1. ABSTRACT

Abundance and aggregation of eggs of *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus and *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) in municipalities in the north and northwest of the state of Paraná, Brazil. The abundance and aggregation of eggs of *Aedes aegypti* L. and *Aedes albopictus* Skuse were evaluated in the municipalities of Cambé, Ibiporã, Jacarezinho, Maringá and Paranavaí, in the State of Paraná, Brazil by means of ovitraps. Of the 225 traps assembled, 100 were registered as positive for eggs; 4140 eggs were collected, thus demonstrating a highly aggregate distribution. Both species were registered in Cambé, Jacarezinho, Maringá and Paranavaí. *A. albopictus* was generally less abundant and was not present in Ibiporã. The proportion between sexes for *A. aegypti* was approximately 1:1. In the comparison of the number of adults collected between the two species, a negative correlation was obtained in the samples of Maringá and Cambé, which was attributed to the seasonality of these populations. The coexistence of these species indicates that both are constrained by the control programs, therefore specific evaluations are necessary.

Key words. Ecology of vectors, ovitraps, Culicidae, aggregation.

4.2. RESUMO

Abundância e agregação de ovos de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus e *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) em municípios da região norte e noroeste do estado do Paraná, Brasil. Avaliou-se a abundância e agregação dos ovos de *Aedes aegypti* L. e *Aedes albopictus* Skuse em Cambé, Ibiporã, Jacarezinho, Maringá e Paranaíba (PR) utilizando-se armadilhas de oviposição. De 225 armadilhas instaladas, 100 registraram-se positivas para ovos. Coletaram-se 4140 ovos, demonstrando distribuição altamente agregada. Ambas as espécies foram encontradas em Cambé, Jacarezinho, Maringá e Paranaíba. *A. albopictus* não foi detectado em Ibiporã, porém onde esteve presente foi menos abundante. A relação entre sexos aproximou-se de 1:1, para *A. aegypti*. Na comparação dos números de adultos coletados entre as duas espécies, obteve-se correlação negativa nas amostras de Maringá e Cambé, o que foi atribuído à sazonalidade dessas populações. A coexistência dessas espécies indica que elas estão sobre pressão dos programas de controle, sendo, portanto necessárias avaliações específicas.

Palavras-chave. Ecologia de vetores, armadilhas de oviposição, culicidae, agregação.

4.3. INTRODUÇÃO

Aedes (Stegomyia) aegypti Linnaeus, 1762 e *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894 (Diptera: Culicidae) são espécies exóticas e simpátricas, a primeira com longo histórico de ocorrência no Brasil e a segunda com introdução notificada em 1986 (Forattini 1986). *A. aegypti* é considerado o único vetor do arbovírus da dengue e da dengue hemorrágica nas Américas. Já *A. albopictus* não possui papel relevante como vetor de arbovírus para o Brasil, porém, experimentalmente, mostrou-se capaz de infectar-se e transmitir o vírus DEN-2 da dengue (Castro *et al.* 2004). Pode-se, no entanto, indicar que ambas as espécies exercem a hematofagia no ambiente antrópico, sendo a primeira encontrada mais frequentemente no ambiente intradomiciliar e a segunda no ambiente extra-domiciliar (Gomes *et al.* 2005).

Estas duas espécies podem coexistir na mesma região e utilizam criadouros de características semelhantes. Colonizam rapidamente locais onde as condições são favoráveis para sua proliferação e, embora as fêmeas não percorram grandes distâncias, sua dispersão é rápida dependendo da disponibilidade de sítios para oviposição (Reiter *et al.* 1995, Marquetti *et al.* 2000, Forattini 2002, Braks *et al.* 2003, Lounibos 2002).

No monitoramento das populações de mosquitos são utilizadas armadilhas para ovos (ovitampas). Estas permitem determinar a dispersão geográfica, densidade, frequência, ocupação, dominância e sazonalidade, porém, não é possível quantificar o número de fêmeas que utilizarão essas armadilhas para oviposição, o que torna o método pouco sensível para o monitoramento de adultos (Glasser & Gomes 2000, Passos *et al.* 2003, Juliano *et al.* 1998).

Com relação a *Aedes aegypti* e *A. albopictus*, existem registros que assumem que a segunda espécie pode exercer melhor vantagem competitiva que em relação à primeira, com distribuição dependente diretamente do tipo de habitat (Braks *et al.* 2003, 2004; Lima-Camara *et al.* 2006).

No Brasil, ainda são poucas as evidências que indiquem um padrão de dominância interespecífica. Porém, algumas observações apontam que o número de indivíduos pode variar de ano para ano, com tendência dominante da mesma espécie, caso específico de *A. aegypti*. Importante destacar que *A. aegypti* e *A. albopictus* até agora ocupam de forma diferenciada os ambientes, urbano e rural respectivamente (Braks *et al.* 2003, Passos *et al.* 2003, Lopes *et al.* 2004).

Vários elementos podem ser observados devido à coexistência e deslocamento das populações do vetor, como o transporte de arbovírus da área rural à urbana, populações selecionadas a inseticidas que não são alvo de controle e a exposição de *A. albopictus* aos sorotipos do vírus da dengue.

O objetivo deste trabalho foi determinar a abundância e coexistência de *A. aegypti* e *A. albopictus* baseada no número e agrupação de ovos destas espécies em municípios com histórico de ocorrência de casos autóctones e importados de dengue no Estado do Paraná.

4.4. MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo. Foram analisados municípios do Estado do Paraná localizados na região Norte: Jacarezinho, Ibiporã, Cambé e Maringá, e Noroeste Paranaíba (Figura 1).

Os municípios analisados possuem predomínio de população na área urbana. Em Jacarezinho 84% da população é urbana e 16% população rural; em Maringá 98% urbana e 2% rural, Paranavaí, Cambé e Iporã têm 93% da população na área urbana e 7% aproximadamente na área rural.

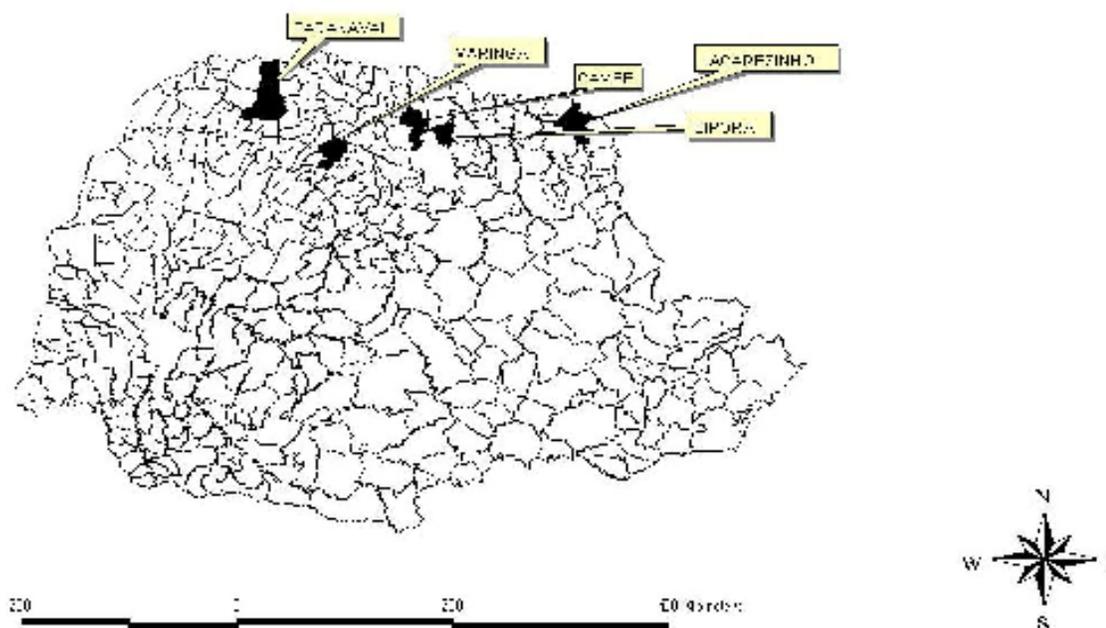


Figura 1. Municípios paranaenses onde foram instaladas as armadilhas de oviposição.

Armadilhas. Foram instaladas, pela Coordenadoria de Pesquisa em Entomologia Médica da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, armadilhas para oviposição nos seguintes municípios e datas: Jacarezinho 18-04-2005 a 22-04-2005 (J1), 16-01-2005 a 20-01-2005 (J2), Maringá 30-05-2005 a 03-06-2005 (M1) e 30-01-2006 a 03-02-2006 (M2), Paranavaí 02-05-2005 a 06-05-2005, Cambé 07-12-2005 a

15-12-2005 (C1) e 15-12-2005 a 21-12-2005(C2) e Ibiporã 15-12-2005 a 21-12-2005. As armadilhas foram distribuídas estrategicamente em lugares com histórico de infestação por mosquitos segundo SISFAD – SESA/PR 2006 (Tabela I). A colocação das armadilhas foi aleatória nos peridomicílios das residências na área urbana, periurbana e central. Em cada município foram instaladas 25 armadilhas, com exceção de Paranaíba com 50 (Tabela II).

Tabela I. Situação da infestação dos municípios de Jacarezinho, Maringá, Paranaíba, Cambé e Ibiporã - 2005-2006 segundo Índice Predial (percentuais anuais) obtido do SISFAD - SESA/PR.

Município	Índice Predial			
	2005		2006	
	<i>A. aegypti</i>	<i>A. albopictus</i>	<i>A. aegypti</i>	<i>A. albopictus</i>
Cambé*	2,75	0,33	2,31	0,51
Ibiporã	0,91	0,32	1,10	0,30
Maringá**	12,33	1,61	33,83	4,61
Jacarezinho	1,12	0,32	5,68	2,04
Paranaíba***	28,90	7,26	-	-

* Até agosto de 2005 e 2006 (sem informações dos dois últimos ciclos), ** Até julho de 2006, *** Até agosto de 2005 (sem informações dos dois últimos ciclos e do ano de 2006). Índice predial = N° de edifícios infestados / N° de edifícios inspecionados x 100

As armadilhas eram constituídas de recipientes plásticos de paredes escuras, dentro das quais era fixada verticalmente uma palheta de madeira (“eucatex”) utilizando um clipe, ficando parcialmente submersas em 500 mL de água com solução de feno a 10% permanecendo em campo por cinco dias. Apenas as palhetas positivas foram registradas e enviadas para o Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da Universidade Federal do Paraná.

As palhetas foram armazenadas na sala de criação de insetos; posteriormente tiveram seus ovos quantificados sob microscópio estereoscópico, no mesmo dia da indução da eclosão. O tempo de armazenamento do material desde a coleta e chegada das cidades de origem não foi homogêneo, porém não ultrapassando três meses.

As paletas foram submersas individualmente em copos com capacidade de 770 mL preenchido com água de torneira submetida à passagem de ar sob pressão para reduzir o teor de cloro. Adicionou-se ração para gatos Purina® Cat Chow® triturada (0.036 g/ copo) para induzir a eclosão, a qual foi administrada diariamente na mesma quantidade diluída em 1 ml de água até a última larva entrar no estágio de pupa.

As palhetas foram retiradas 24 horas após a imersão, em função do decréscimo da qualidade da água quando estas são mantidas nos copos por longos períodos, devido à propriedades físicas das palhetas. As larvas foram mantidas nestes copos até o estágio de pupa e nesta fase foram retiradas e colocadas em gaiolas rotuladas com o número e localidade da palheta, para captura dos adultos emergidos, registrando-se quanto ao sexo e espécie, e depois descartados (Figura 2). Todo o processo de criação e armazenamento do material foi em condições controladas de temperatura ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade ($80\pm 10\%$) e fotoperíodo (12L:12O).

Análise dos resultados

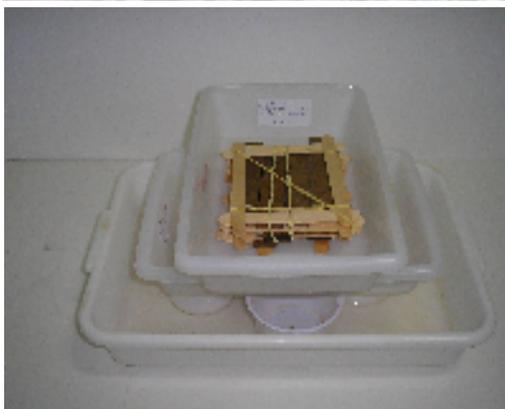
Para determinar a aleatoriedade e a agregação na postura dos ovos em relação às armadilhas e a distribuição dos ovos nas palhetas, foi calculado a razão variância/média (coeficiente de dispersão):

$$I = \frac{S^2}{\hat{m}},$$

onde S^2 = variância e \hat{m} = média. Valores menores que 1 aponta disposição espacial regular ou uniforme, valores iguais a 1 indicam disposição espacial aleatória e valores significativamente maiores que 1 revela disposição agregada (Rabinovich 1980, Pereira *et al.* 2004). Os resultados foram analisados com o programa “Statistica v 6”, onde cada coleta foi considerada separadamente, mesmo quando eram realizadas em localidades já amostradas. Apenas os dados com $p < 0.05$ foram considerados como significativos. Para verificar as diferenças estatísticas foram aplicados os testes não-paramétricos Kruskal-Wallis (KW) e Mann-Whitney U (MW). Para a análise de correlação foi empregado o teste de Spearman (r_s).



a)



b)



c)

Figura 2. a) Instalação das armadilhas de oviposição, b) Armazenamento e c) Indução a eclosão e separação de indivíduos para determinar a abundância e coexistência de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em municípios do Paraná.

4.5. RESULTADOS

A positividade das palhetas (I.O) oscilou entre 36 e 72 % nos municípios analisados. Houve predomínio de *Aedes aegypti* sobre *Aedes albopictus*, em ocorrência não simultânea com os percentuais sendo, respectivamente, de 54,6% e 24% do total de armadilhas instaladas, enquanto a ocorrência concomitante das espécies atingiu 16,6% de positividade. Entre os municípios analisados, apenas em Ibiporã não foi detectada a presença de *A. albopictus*.

Tabela II. Positividade das palhetas e coexistência de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* nos municípios de Jacarezinho, Maringá, Paranavaí, Cambé e Ibiporã.

Localidades	N° Palhetas	<i>A. aegypti</i>		<i>A. albopictus</i>		Ambas as espécies		Total		
		Palhetas Positivas	N° Adultos	Palhetas Positivas	N° Adultos	Palhetas Positivas	N° Adultos	Palhetas Positivas	I.O %	N° Adultos
Jacarezinho J1	25	4	22	3	33	2	26	9	36	55
J2	25	14	97	13	139	10	171	17	68	236
Maringá M1	25	9	242	2	26	2	38	9	36	268
M2	25	11	179	0	0	0	0	18	72	179
Paranavaí	50	10	134	2	6	2	100	14	28	140
Cambé C1	25	7	44	2	2	2	15	14	56	46
C2	25	2	2	4	4	0	0	14	56	6
Ibiporã	25	2	30	0	0	0	0	13	52	30

(J1) primeira coleta de Jacarezinho, (J2) segunda coleta de Jacarezinho, (M1) primeira coleta de Maringá, (M2) segunda coleta de Maringá, (C1) primeira coleta de Cambé (C2) segunda coleta de Cambé. Índice de oviposição (I.O): número de palhetas positivas * 100/número total de palhetas.

Tabela III. Atividade de oviposição, eclosão e sexagem de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* nos municípios de Jacarezinho, Maringá, Paranavaí, Cambé e Ibiporã.

Localidade		N° ovos	% eclosão	N° adultos	<i>A. aegypti</i>			<i>A. albopictus</i>		
					Total	♀	♂	Total	♀	♂
Jacarezinho	J1	354	2,1	55	22	12	10	33	24	9
	J2	1024	23	236	97	39	58	139	51	88
Maringá	M1	544	49,2	268	242	108	134	26	13	13
	M2	428	41,8	179	179	96	83	0	0	0
Paranavaí		389	36	140	134	60	74	6	1	5
	C1	775	6	46	44	21	23	2	1	1
Cambé										
	C2	277	2	6	2	2	0	4	2	2
Ibiporã		349	8,5	30	30	12	18	0	0	0

(J1) primeira coleta de Jacarezinho, (J2) segunda coleta de Jacarezinho, (M1) primeira coleta de Maringá, (M2) segunda coleta de Maringá, (C1) primeira coleta de Cambé (C2) segunda coleta de Cambé.

A porcentagem de adultos obtidos, a partir de ovos, independente da espécie oscilou entre 2,1% e 49,2%, porém com acentuado predomínio para obtenção de adultos de *A. aegypti*, a única exceção ocorreu em Jacarezinho onde, nos dois períodos analisados, o número de adultos de *A. albopictus* suplantou o de *A. aegypti*. As menores razões de obtenção de adultos ocorreram para Cambé e Ibiporã, as maiores foram para Maringá e Paranavaí, embora o número de ovos recolhidos das palhetas estivesse relativamente próximo das demais localidades avaliadas (Tabela III).

A relação variância/média (I) aplicada para verificar a disposição dos ovos nas armadilhas indicou disposição agregada destes nas palhetas com I=52.38 (J1), 33.07 (J2), 24.52 (M1), 17.97 (M2), 42.26 (Paranavaí), 71.47 (C1), 32.17 (C2) e 36.57 (Ibiporã).

A oviposição de *Aedes* spp. por municípios apresentou diferenças estatisticamente significativas (KW = 18.80470, $p= 0.0088$, $X^2= 26.72803$, $p= 0.0004$), assim como o número de adultos (KW= 51.37905, $p= 0.00$, $X^2= 41.50422$, $p= 0.00$). A comparação entre sexo e localidade para *A. aegypti* e *A. albopictus* também revelou diferenças entre os municípios (fêmeas de *A. aegypti* KW= 33.96775, $p= 0.0001$, $X^2= 30.02993$, $p= 0.0004$; machos de *A. aegypti* KW= 44.47878, $p= 0.0000$, $X^2= 42.94308$, $p= 0.0000$; fêmeas de *A. albopictus* KW= 35.51414, $p= 0.0002$, $X^2= 31.81521$, $p= 0.0002$ e machos de *A. albopictus* KW= 44.47878, $p= 0.0000$, $X^2= 42.94308$, $p= 0.0000$). *A. aegypti* apresentou proporção sexual de fêmeas por macho de 0,83:1 e 1,48:1 em Jacarezinho, 1,24:1 e 0.89:1 em Maringá, 1,23:1 em Paranaíba, 1,09:1 e 2:0 para Cambé, e 1,5:1 em Ibiporã. Para *A. albopictus* essa relação foi de 0,38:1, 1,72:1 Jacarezinho, 1:1, 0:0 para Maringá, 5:1 Paranaíba, 1:1 e 1:1 para Cambé e 0:0 para Ibiporã.

Foi constatada que há correlação negativa entre abundância de *A. aegypti* e *A. albopictus* em Maringá (M1; $r_s = -0.38$, $p < 0.05$) e Cambé (C2; $r_s = -0.26$, $p < 0.05$), o que poderia indicar relação inversamente proporcional das espécies nestes municípios.

4.6. DISCUSSÃO

Apesar das características ambientais dos municípios estudados serem semelhantes, foram detectadas diferenças significativas no número de ovos, adultos emergidos e proporção no sexo dos adultos que eclodiram em laboratório. A diferença na frequência de ovos pode ser consequência da variação sazonal de adultos, sendo mais acentuada para *A. albopictus* (Serpa *et al.* 2006). Isto também

explicaria a correlação negativa entre as espécies detectada em Maringá (2005) e Cambé (2).

Os índices de oviposição para monitoramento das populações de vetores apenas determinam o número de ovos sem diferenciar as espécies e a quantidade de adultos que emergem das armadilhas. Todavia, alguns elementos podem ser levantados para interpretar melhor a forma de colonização destas espécies, como uma possível diminuição na emergência dos adultos, como resultado da competição interespecífica das larvas. Segundo Juliano *et al.* (2004), este evento pode contribuir para o declínio de uma espécie em relação à outra o que afetaria a produção total de adultos de um determinado criadouro. Ou também, que as diferenças no tempo de armazenamento das palhetas podem ter contribuído com as baixas taxas de eclosão.

As diferenças nas proporções sexuais podem estar relacionadas a uma eventual dispersão sexual interespecífica, sendo apenas vislumbrada pelas alterações proporcionais entre machos e fêmeas por localidade. Para *A. aegypti* a proporção sexual foi o esperado, já para *A. albopictus* afastou-se do esperado. A nossa percepção dos resultados é baseada nos dados apresentados por Lima-Camara *et al.* (2006), nos quais adultos coletados em três ambientes (urbano-suburbano-rural) de *A. albopictus* teriam tal discordância em suas razões sexuais, isto é evidente quando se compara o número de adultos machos e fêmeas deste trabalho. No entanto, é necessário avaliar esta relação de sexo com uma escala maior de armadilhas, pode ser que para *A. albopictus* esta tenha sido inconsistente pelo baixo número de premissas ou devido ao lugar onde as armadilhas foram instaladas.

A espécie predominante nos municípios foi *Aedes aegypti*, como se observa nos levantamentos de índices prediais (SISFAD – SESA/PR). Entretanto, *A. albopictus* apresentou-se em maior quantidade em Jacarezinho, município com maior porcentagem de população na área rural, o que pode ser indicativo de que a infestação pode estar ocorrendo a partir da zona rural como verificado para Londrina (PR) por Lopes *et al.* (2004), onde a população de *A. aegypti* diminui no limite da área urbana para a rural ao mesmo tempo em que aumenta *A. albopictus*.

Segundo Silva (2002), no município de Sertaneja, Norte do Estado do Paraná, o *A. albopictus* já tem registros de ocupação de áreas urbanas e está colonizando os mesmos substratos de oviposição de *A. aegypti*. A eficiência na utilização das armadilhas pela primeira espécie evidencia seu ecletismo e sua penetração no ambiente natural, onde potencialmente pode participar como vetor em ciclos de transmissão silvestres (Forattini *et al.* 1998, Santos 2003). Isto de fato indica a preferência de *A. albopictus* por áreas com características de transição entre urbana e rural (Lopes *et al.* 2004, Gomes *et al.* 2005).

Estando comprovado que estas espécies têm a capacidade de colonizar os mesmos criadouros, espera-se que a pressão de controle com inseticidas atinja igualmente às populações deste táxon, caso sejam susceptíveis. E como resultado desta pressão espera-se que a resistência química apareça em um futuro próximo, como ocorrido para *A. aegypti* reportada em vários estados do território brasileiro ao temefós e cipermetrina (Macoris *et al.* 2003, Lima *et al.* 2003, Braga *et al.* 2004, Carvalho *et al.* 2004, Duque *et al.* 2004, Lima *et al.* 2006).

A agregação dos ovos foi quantificada em conjunto, sem distinção da espécie no momento da contagem dos mesmos. Os valores indicaram que a distribuição no ambiente foi altamente agregada, sugerindo que fêmeas podem estar limitadas no

sentido de demanda de criadouros pois a procura ativa de fêmeas grávidas por estes locais pode ser influenciada pelos estímulos químicos “semioquímicos”, originando tal fenômeno (Bentley & Day 1989, McCall & Cameron 1995, Kaur *et al.* 2003).

A utilização dos índices entomológicos como fator exclusivo para *Aedes aegypti* podem resultar em dados incompletos, por exemplo; no caso de instalação de ovitrampas em locais onde não há histórico da presença de indivíduos de *A. albopictus*, na eventualidade de sua ocorrência, esta não seria detectada assim como sua provável dispersão ou mesmo ocorrência simultânea com *A. aegypti*. Isto coloca em evidência a importância de criar medidas operacionais práticas que permitam fazer uma medição precisa dos índices de oviposição levando em conta a especificidade e a coexistência entre as espécies os padrões de distribuição espacial.

A coexistência destas espécies foi detectada com relativa frequência, indicando a necessidade do conhecimento preciso dos aspectos comportamentais que governam estes mosquitos. Diante do cenário avaliado, seria estratégico determinar sistematicamente os níveis de infestação das populações de *A. albopictus* e *A. aegypti* no Estado do Paraná, tendo em conta a sazonalidade, e a dispersão das áreas periféricas às urbanas como também incluir o *A. albopictus* no monitoramento da resistência aos principais inseticidas utilizados para *A. aegypti*.

4.7. Conclusões

Nas armadilhas de oviposição encontram-se além do *A. aegypti* o *A. albopictus*, as vezes coexistindo.

Foi determinado que ovos de *Ae. aegypti* foram mais abundantes e frequentes nas armadilhas.

A eclosão e número de adultos foram diferentes em todos os municípios. No entanto, a oviposição foi agregada em todos os municípios

AGRADECIMENTOS

À Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, especialmente às equipes dos núcleos de pesquisa em entomologia pelo envio do material para realização do presente trabalho.

4.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Braks, M. A. II.; Honório, N. A.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Juliano, S. A. & Lounibos, L.P. 2003. Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. **Journal of Medical Entomology** **40**: 785-794.
- Braks, M. A. II.; Honório, N. A.; Lounibos, L.P.; Lourenço-de-Oliveira, R & Juliano, S. A. &. 2004. Interspecific competition between two invasive species of container mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae), in Brazil. **Annals of the Entomological Society of America** **97**: 130-139.
- Bentley, M. D & Day, J. F. 1989. Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. **Annual Review of Entomology** **34**: 401-421.
- Braga, I.A.; Lima, J.B.P.; Silva, S. S & Valle, D. 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **99**: 199-203.
- Carvalho, M. S. L.; Caldas, E. D.; Degallier, N.; Vilarinhos, P de T. R.; de Souza, L. C. K.; Yoshizawa, M. A .C.; Knox, M. B & Oliveira, C. 2004. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to the insecticide temephos in the Federal District, Brazil. **Revista de Saúde Pública** **38**: 623-629.
- Castro, M. G.; Nogueira, R. M. R.; Schatzmayr, H. G.; Miagostovich, M. P. & Lourenço-de-Oliveira, R. 2004. Dengue virus detection by using reverse transcription polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **99**: 809-814.

- Duque, J. E. L.; Martins, F.M.; Dos Anjos, F. A.; Kuwabara, E.F & Navarro- Silva, M.A. 2004. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas Temephos e Cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública** **38**: 842-843.
- Forattini, O. P. 1986. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. **Revista de Saúde Pública** **20**: 244-245.
- Forattini, O. P.; Marques. G. R. A. M. & Brito. M. 1998. An unusual ground larval habitat of *Aedes albopictus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** **40**: 121-122.
- Forattini, O. P. 2002. **Culicidologia Médica**, vol. 2: Identificação, Biologia, Epidemiologia. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo.
- Glasser, C. M. & Gomes, A. C. 2000. Infestação do Estado de São Paulo por *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. **Revista de Saúde Pública** **34**: 570-577.
- Gomes, A. C.; Souza, J. M. P.; Bergamaschi, D.; Santos, J. L. F.; Andrade, V. R.; Leite, O. F. Rangel, O.; Souza, S. S. L. Guimarães, N. S. N. & Lima, V. L. C. 2005. Atividade antropofílica de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em área sob controle e vigilância. **Revista de Saúde Pública** **39**: 206-210.
- Juliano, S. A. 1998. Species introduction and replacement amount mosquitoes: interspecific resource competition or apparent competition?. **Ecology** **79**: 255-268.
- Juliano, S. A.; Lounibos, L. P. & O'Meara, G. F. 2004. A field test for competitive effects of *Aedes albopictus* on *A. aegypti* in South Florida: differences between sites of coexistence and exclusion? **Oecologia** **139**: 583-593.
- Kaur, J. S.; Lai, Y. L & Giger, A. D. 2003. Learning and memory in the mosquito *Aedes aegypti* shown by conditioning against oviposition deterrence. **Medical and Veterinary Entomology** **17**: 457-4760.

- Lima-Camara, T. M.; Honório, N. A & Lourenço-de-Oliveira. R. 2006. Frequência e distribuição espacial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Díptera, Culicidae) no Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública** **22**: 2079-2084.
- Lima, J. B. P.; Pereira da Cunha M.; Silva-Jr R. C. S.; Galardo, A. K. R.; Soares, S. S.; Braga, I. A.; Ramos, R. P.; Valle, D. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **68**: 329-333.
- Lima, E. P.; Oliveira, A. M. F.; Lima, J. W. O.; Ramos, A. N. J.; Cavalcanti, L. P. G & Pontes, R. J. S. 2006. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **39**: 259-263.
- Lopes, J.; Martins, E. A. C.; Oliveira, O.; Oliveira, V.; Oliveira Neto, B. P & Oliveira, J. E. 2004. Dispersion of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) and *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) in the rural zone of north Paraná State. **Brazilian Archives of Biology and Technology** **47**: 739-746.
- Lounibos, L. P. 2002 Invasions by insect vectors of human disease. **Annual Review of Entomology** **47**: 233-266.
- McCall, P. J & Cameron, M. M. 1995. Oviposition pheromones in insect vectors. **Parasitology Today** **11**:352-356.
- Macoris, M. L. G.; Andrighetti, M. T.; Takaku, L.; Glasser, C. M.; Garbeloto, V. C & Bracco, J. E. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to Organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **98**: 703-708.

- Marquetti M. C.; Valdés, V & Aguilera, L. 2000. Tipificación de hábitats de *Aedes albopictus* en Cuba y su asociación con otras especies de culícidos, 1995-1998. **Revista Cubana de Medicina. Tropical 52**: 170-174.
- Passos, R. A.; Marques, G. R. A. M.; Voltolini, J. C. & Condino, M. L. F. 2003. Dominância de *Aedes aegypti* sobre *Aedes albopictus* no litoral sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública 37**: 729-734.
- Pereira, M. F. A.; Boiça Jr., A. L. & Barbosa, J. C. 2004. Distribuição espacial de *Bemisia tabaci* (Genn.) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Neotropical Entomology 33**: 493-498.
- Rabinovich, J. E. 1980. **Introducción a la ecología de poblaciones animales**. México, Continental, 313 p.
- Reiter P.; Amador M.A.; Anderson R.A & Clark G. C. 1995. Short report: dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked egg. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 52**: 177-179.
- Santos, R. C. 2003. Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (1997-2002). **Revista de Saúde Pública 37**: 671-673.
- Serpa, L. L. N.; Costa, K. V. R.; Voltolini, J. C & Kakitani, I. 2006. Variação sazonal de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no município de Potin, São Paulo. **Revista de Saúde Pública 40**: 1101-1105.
- SISFAD - SESA/PR. 2006. Sistema de Informação de Febre Amarela e Dengue. Ministério da Saúde, programa de computador utilizado pela FUNASA, em nível nacional, para processar dados obtidos nas atividades de campo desenvolvidas pelos Agentes de Saúde. SESA/PR – Secretaria de Estado da Saúde do Paraná.
- Silva, A. M. 2002. Imaturos de mosquitos (Diptera, Culicidae) de áreas urbana e rural no norte do Estado do Paraná, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia 92**: 31-36.

5. CAPITULO IV

Modelo de transmissão da dengue: tratamento integrado do vetor *Aedes aegypti* considerando resistência química a inseticidas

5.1. ABSTRACT

Model of dengue transmission: integrated treatment of the vector *Aedes aegypti* considering chemical resistance to insecticides. A mathematical model type SDIR (susceptible, displayed, infectious and removed) was simulated including the population of human hosts, dengue vectors and strategies for the control of *Aedes aegypti*. The simulations results confirmed that applications of insecticides must be done including both larval and adult stages of the vector in order to quickly reduce the epidemic. Also, in order to avoid loss of efficacy in the mosquito control, it is necessary to use highly efficient insecticides and guarantee that they have high coverage to achieve a permanent removal of vector breeding sites. Based on the simulations, it is concluded that the densities of the vector must be kept close to zero throughout the year to avoid the coexistence of host and vector.

Key words. Epidemiology, dengue, chemical resistance, *Aedes aegypti*.

5.2. RESUMO

Modelo de transmissão da dengue: tratamento integrado do vetor *Aedes aegypti* considerando resistência química a inseticidas. Foi simulado um modelo matemático tipo SEIR (susceptível, exposto, infeccioso e removido) incluindo população dos hospedeiros humanos, vetores da dengue e estratégias de controle do vetor *Aedes aegypti*. Os resultados das simulações confirmaram que aplicações de inseticidas devem ser combinadas nos estados larvários e adultos do vetor para diminuir rapidamente a epidemia. Também, se observou que para não comprometer o controle do mosquito, é necessário que os inseticidas sejam altamente efetivos e que as aplicações tenham alta cobertura de efetividade, e que estejam sempre acompanhados de permanente remoção de criadouros. Pode-se concluir com as simulações do modelo que as densidades do vetor devem ser mantidas próximas de zero em todos os períodos do ano para evitar totalmente a coexistência hospedeiro - vetor.

Palavras-chave. Epidemiologia, dengue, resistência química, *Aedes aegypti*.

5.3. INTRODUÇÃO

O problema epidemiológico da dengue e dengue hemorrágica, com aumento exponencial nas últimas décadas, é conseqüência de fatores como a urbanização não planejada, mudanças demográficas e migração em grande escala (Kroeger & Nathan 2007) influenciada pelas facilidades de transporte aéreo e terrestre. Embora conhecimento suficiente relacionado à dengue tenha-se acumulado desde há dois séculos, (Periago & Guzmán 2007), esta arbovirose continua sendo um dos principais enigmas epidemiológicos que necessita ser resolvido no século XXI.

Dentro das possibilidades reais de controle desta doença, está a redução da densidade do vetor através da utilização de produtos químicos e eliminação física dos criadouros potenciais das formas imaturas. O sucesso desta tarefa está diretamente ligado à conscientização e comprometimento da sociedade por meio de ações individuais e coletivas de eliminação de criadouros do vetor. No entanto, o aumento observado dos casos da dengue nos últimos anos, indica que estas ações não estão sendo suficientes. Uma das possíveis soluções seria criar uma vacina que confira imunidade a toda população contra todos os sorotipos da dengue DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (Gubler 1998); infelizmente esta possibilidade ainda está longe de se alcançar.

Para entender o porquê do problema de ocorrência das epidemias, apesar das atividades de controle do vetor, é necessário recapitular algumas questões. Só existe a dengue por que existe o contato entre o vetor e a pessoa infectada (portadora do vírus na fase transmissível); outra possibilidade é a transmissão vertical nas populações de vetores, embora em taxas reduzidas, como demonstrada em *Aedes aegypti* (Joshi *et al.* 2002); no entanto seu significado para a manutenção

das endemias é desconhecido. De qualquer forma os argumentos anteriores indicam que é necessário evitar a coexistência de vetores e pessoas infectadas ou entender até que ponto esta pode ocorrer.

A dengue se transmite da seguinte forma: pessoas susceptíveis a todos os sorotipos do vírus da dengue que se dispersam eventualmente a áreas endêmicas onde circula ao menos uma destas formas virais, e são expostas através do contacto com o vetor infectado, desenvolvem a doença. Ao regresso ao seu lugar de origem, com a doença no período infeccioso, entram em contacto novamente com o vetor susceptível e certamente gerará o ciclo da doença nesse lugar, infectando pessoas susceptíveis. E no caso de existir pessoas já expostas aos outros sorotipos diferentes do vírus, existe a possibilidade de evolução para dengue hemorrágica (Gubler 1998, Jelinek 2000).

Pode-se afirmar que as entidades de Saúde de todos os países, onde a dengue esta presente, fazem esforços significativos na tentativa de controlar o vetor; infelizmente, com repercussão apenas temporal na diminuição dos casos. Depois de um período de baixa incidência, enfrentam-se novamente epidemias com elevação substancial do número de casos. Um desenho experimental que explique este fenómeno em grande escala é praticamente impossível, devido à falta de controle das muitas variáveis ligadas epidemiologicamente a esta doença, como a quantidade de vetores e de pessoas infectadas necessárias para iniciar uma epidemia, o papel da imunidade a um sorotipo específico do arbovirus; a imunidade coletiva relacionada com os surtos da doença; impacto das estratégias de controle baseadas em inseticidas químicos; e remoção dos criadouros potenciais do vetor. Uma forma mais aproximada para entender todas estas variáveis, em conjunto, em

escala global, é viabilizada através da utilização de modelos matemáticos (Hasting 1997).

Vários trabalhos com diferentes enfoques epidemiológicos e abordagens matemáticas têm explicado este problema, no sentido de tomar decisões desde um ponto de vista holístico que auxiliem na elaboração de programas de controle da doença e do vetor. Entre os principais modelos destacam-se o de Newton & Reiter (1992), que levantaram a questão sobre o tratamento do vetor no estado adulto com aplicações de inseticidas (ultra-baixo-volume), indicando que o impacto na incidência da doença poderia ser mínimo, ou apenas retardaria o aparecimento da epidemia. Esteva & Vargas (2000) indicaram que a transmissão vertical poderia favorecer a presença permanente do vírus da dengue em áreas rurais florestais com baixa densidade humana. Derouich *et al.* (2003) e Derouich & Boutayeb (2006) avaliaram uma vacina hipotética com programas de diminuição do vetor, indicando esta como a única possibilidade de erradicação da doença, uma vez que os tratamentos focalizados apenas na redução do vetor somente retardam o aparecimento da epidemia. Entretanto Burattini *et al.* (2007) analisaram a influência da sazonalidade na relação vetor – dengue, incluindo diferentes estratégias de controle do vetor nos estados larvais e adultos e concluíram que é possível cortar rapidamente a prevalência da dengue aplicando ataques múltiplos de tratamentos ao vetor.

Embora seja óbvio que para não haver incidência da dengue é necessário controlar as populações do vetor, como demonstrado pelos modelos matemáticos, observa-se na que algo nesta afirmação não está corretamente correlacionado com a realidade. No caso do Brasil, o problema da dengue é gigantesco quando se compara com outros países com a mesma situação. Nossa hipótese é que, num

contexto meramente entomológico, o controle de vetores está focalizado para a diminuição parcial do vetor, priorizando intensamente os pólos estratégicos, descuidando de outros lugares com maior incidência, porém com menos interesse turístico e comercial (Capítulo I). Vários fatores têm pesos diferenciados, afetando negativamente o controle da dengue, como a resistência a inseticidas registrada em vários estados brasileiros: São Paulo, Rio de Janeiro, Sergipe, Alagoas, Brasília, Paraná, Ceará e Paraíba (Macoris *et al.* 1999; Campos & Andrade 2001; Macoris *et al.* 2003; Lima *et al.* 2003; Braga *et al.* 2004; Carvalho *et al.* 2004; Duque *et al.* 2004; Lima *et al.* 2006; Beserra *et al.* 2007). A baixa cobertura das aplicações dos inseticidas, que não se atingem totalmente a população dos vetores adultos, porque as fêmeas grávidas se refugiam em lugares onde a distância das aspersões não as atingem (Perich *et al.* 2000; Castro *et al.* 2007), e as atividades culturais de remoção de criadouros do vetor realizadas pela comunidade.

Diante deste cenário, tem-se como objetivo simular um surto da dengue incluindo várias estratégias de controle, ligadas a possíveis problemas que comprometem o controle de vetores, como resistência a inseticidas químicos, baixa cobertura das aplicações dos inseticidas e atividades de controle cultural do vetor.

5.4. MATERIAL E MÉTODOS

O modelo de transmissão da dengue utilizado neste trabalho é uma modificação do trabalho de Newton & Reiter (1992), selecionado, principalmente, por ser um trabalho amplamente discutido e por incluir a possibilidade de simular controle do vetor no estado adulto com inseticidas. Foram realizadas alterações nas equações originais para observar o comportamento das variáveis em uma área com

diferentes opções de tratamento do vetor, destacando cenários com perda de potência dos produtos químicos (resistência química), efetividade das aplicações do inseticida relacionada à cobertura de criadouros atingidos e controle cultural da população, como mutirões de limpeza para eliminação dos criadouros potenciais.

No geral, o modelo segue os princípios dos modelos tipo SEIR (susceptíveis, expostos, infectados e removidos). Dentro desta lógica, se consideram duas populações, os hospedeiros humanos (susceptíveis, expostos, infectados e removidos) e os vetores (susceptíveis, expostos e infectados). As variáveis do modelo são descritas por equações diferenciais da forma $dX/dt = FR \times X$, onde X é a variável de estado, t é o tempo e FR é uma taxa de incremento. A taxa de incremento pode ser constante ou depender de outras variáveis do sistema de equações.

O seguinte sistema de equações e fluxograma (Figura 1) descreve a dinâmica vital dos hospedeiros humanos e vetores (Tabela I, II).

$$\begin{aligned} \frac{dSh}{dt} &= \frac{H}{Tlh} - Sh \left(Iv \frac{Cvh}{H} + \frac{1}{Tlh} \right) \\ \frac{dEh}{dt} &= ShIv \frac{Cvh}{H} - Eh \left(\frac{1}{Tii} + \frac{1}{Tlh} \right) \\ \frac{dIh}{dt} &= \frac{Eh}{Tii} - Ih \left(\frac{1}{Tid} - \frac{1}{Tlh} \right) \\ \frac{dRh}{dt} &= \frac{Ih}{Tid} - \frac{Rh}{Tlh} \\ \frac{dSv}{dt} &= \frac{Mx}{Tiv} (1-w) - Sv \left(Ih \frac{Chv}{H} + \frac{1}{Tiv} + \frac{Y}{Tiv} \right) \\ \frac{dEv}{dt} &= SvIh \left(\frac{Chv}{H} \right) - Ev \left(\frac{1}{Teit} + \frac{1}{Tiv} + \frac{Y}{Tiv} \right) \\ \frac{dIv}{dt} &= \frac{Ev}{Teit} - \frac{Iv}{Tiv} - \frac{Y}{Tiv} \end{aligned}$$

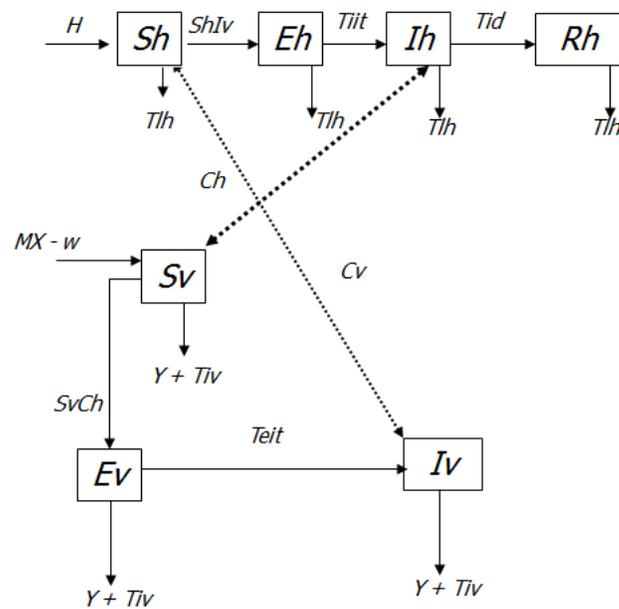


Figura 1. Equações e fluxograma do modelo de transmissão da dengue.

Tabela I. Variáveis do modelo de transmissão da dengue.

Variável	Símbolo	Valor inicial
Hospedeiro susceptível	<i>Sh</i>	10 000
Hospedeiro exposto	<i>Eh</i>	0
Hospedeiro infeccioso	<i>Ih</i>	1
Vetor susceptível	<i>Sv</i>	20 000
Vetor exposto	<i>Ev</i>	0
Vetor infeccioso	<i>Iv</i>	0

Tabela II. Parâmetros do modelo de transmissão da dengue.

Parâmetro	Símbolo	Valor
Tempo de vida médio do hospedeiro	T_{lh}	25 000 dias (68.5 anos)
Taxa de contato efetivo vetor a hospedeiro	C_{vh}	0,75
Tempo intrínseco de incubação do vírus	T_{iit}	5 dias
Tempo extrínseco de incubação do vírus	T_{eit}	6
Duração da infecção no hospedeiro	T_{id}	3 dias
Total de indivíduos imaturos que incrementam (larvas) os adultos Sv.	M	20000*
Taxa de incremento de M	X	0,53**
Tempo de vida medio do vetor	T_{iv}	12*
Taxa de controle integrado 1 = efetividade do inseticida, cobertura do inseticida e controle cultural.	W	Ver figuras (6, 7, 8 e 9)
Taxa de contato efetivo hospedeiro a vetor.	Chv	0,375
Taxa de controle no estado adulto (adulticida).	Y	30, 60, 90, 100 %
Número total de humanos	H	10 000*

* Valor hipotético. ** dado sugerido a partir do capítulo III.

É incluída a dinâmica vital dos hospedeiros humanos e vetores, por exemplo, incremento e mortalidade dos hospedeiros e vetores, da seguinte forma: H/T_{lh} e Mx/T_{iv} , respectivamente para hospedeiros, consideram o número total de indivíduos de todas as idades e sexo que podem se contagiar apenas com uma única cepa do vírus e o tempo médio de vida de um hospedeiro normal, aproximadamente 68,5

anos (Newton & Reiter 1992). Para o vetor, se considera como uma quantidade de mosquitos total ($M = S_v + E_v + I_v$), que se incrementa numa taxa (x) estimada de dados através de armadilhas de oviposição, onde é seguido todo o processo de desenvolvimento desde ovo até adulto do vetor (Capítulo III). E o tempo de vida médio do vetor (12 dias) foi estimado com base em nossa experiência com dados de criação por geração de *Aedes aegypti* em laboratório (dados não publicados), a maioria dos parâmetros do modelo são os mesmos utilizados por Newton & Reiter (1992).

As taxas de contágio do hospedeiro e vetor são as mesmas do trabalho de Newton & Reiter (1992), representadas pelo contato dos hospedeiros susceptíveis (S_h), com o vetor infectado (I_v), relacionado com a taxa efetiva de contacto do vetor hospedeiro C_{vh}/H , que é determinada pela probabilidade de transmissão de um sorotipo da dengue, hospedeiro vetor (a_{hv}) e a taxa de picadas do (S_v) por dia (b_s), assim $C_{vh} = a_{hv} b_s$. O contágio do vetor susceptível (S_v), representado por Chv/H , que é determinado pela probabilidade de transmissão de um sorotipo da dengue do vetor ao hospedeiro (a_{vh}) e a taxa de picada dos (I_v) por dia (b_i), $Chv = a_{vh} b_i$.

Os parâmetros que indicam controle integrado do vetor (w) inseticidas larvários, temefós e (Y) inseticidas para controle do vetor no estágio adulto, são uma somatória das ações de controle que é incorporada ao modelo original. Sendo da seguinte forma; perda de potência ou ineficiência do inseticida como consequência da resistência química a inseticidas, possibilidade de que ações de controle não atinjam o total dos criadouros, no caso específico os estados larvários e o total dos estados adultos do vetor, este parâmetro é considerado como porcentagem de cobertura. E as ações de tipo cultural de controle do vetor, especificamente, remoção permanente dos criadouros potenciais do vetor efetuado pela população de

forma espontânea, diferente do trabalho efetuado pelos agentes de saúde contratados para esta função. Foi considerada a somatória destes parâmetros como de 100% de efetividade para demonstrar a importância de entender o controle do vetor como uma ação múltipla de componentes que devem ser cuidadosamente planejados para não comprometer o controle do mosquito. O programa computacional para simular o modelo foi o Populus 5.4 (Alstad 2005).

5.5. RESULTADOS

Num surto da dengue a necessidade de controle do vetor é iminente, no entanto, é primordial entender os alcances e o impacto das estratégias destinadas a diminuir o evento epidêmico. Para isto, foram simulados os seguintes cenários de transmissão: a transmissão da dengue, sem presença de infectados (vetor ou hospedeiro) é caracterizada pela coexistência do vetor com o hospedeiro em ausência da doença (Figura 2). Considerando a entrada de pelos menos um infectado (vetor ou hospedeiro) num ambiente onde coexistem homem e mosquitos em grandes densidades distribuídas espacialmente em vários locais, inevitavelmente acontece um surto epidêmico. Desta forma o incremento dos hospedeiros infecciosos (I_h) é diretamente influenciado pelo contacto com vetores infecciosos (I_v), e em condições livres de qualquer tipo de controle das populações do mosquito ($M = S_v + E_v + I_v$), se desencadeia a epidemia (Figura 3).

Após o início da epidemia, as medidas de controle são acionadas intensamente e pode se esperar com uma aplicação de inseticida hipoteticamente efetiva (100% de controle) para tratar o estágio larvário e adulto. Resulta que o número de I_v diminui visivelmente em quantidade, no entanto o período epidêmico é

apenas levemente reduzido, em relação à não aplicação de nenhum tipo de controle dos vetores (Figura 4).

Segundo o modelo, num surto epidêmico, é necessário dimensionar a efetividade das ações de controle. As aplicações de inseticidas apresentam melhores resultados na redução do vetor quando dirigidas ao estágio adulto que as larvas do vetor; sendo que o ideal é a combinação de ataque múltiplo sobre larvas e adultos ao mesmo tempo, como na Figura 3. Se, for aplicado este controle apenas em larvas, os adultos do mosquito permanecem vivos, alimentando-se e ovipositando, conseqüentemente multiplicando sua população. E se apenas se controlam os adultos, as larvas não tratadas restauram novamente sua população (Figuras 5 e 6).

As ações de controle se complicam se for incluída a possibilidade de perda de potência dos inseticidas por causa de resistência química que pode comprometer o controle do vetor. Este evento poderá ser mais drástico dependendo se a resistência é para os inseticidas que atacam larvas ou adultos, como apresentado anteriormente. No caso de inseticidas larvários como o temefós, uma perda de potência de 30%, resulta em uma leve alteração no número de I_h e I_v . No entanto, é considerada uma combinação desta perda de 20% na ação do inseticida sobre estágios larvários e 50% de potência do inseticida para controle de vetores no estágio adulto, o resultado é que a dinâmica da doença permanece, aumentando o número dos casos da dengue. (Figuras 7, 8 e 9).

Em vista do anterior, é indiscutível que é necessário evitar a epidemia, estabelecendo condições para manter o menor número possível de indivíduos iniciais do vetor, próximos a zero. Assim, mesmo considerando o aparecimento da resistência química a inseticidas, serão reduzidos mais rapidamente e na seqüência

também os hospedeiros infecciosos (Figuras 10 e 11). Considerando uma perda de potência do inseticida de 10% ocorre diminuição significativa dos vetores infecciosos e dos hospedeiros infecciosos. A necessidade de manter as populações do vetor a níveis baixos é apresentada nas Figuras 12, 13 e 14, mesmo considerando a possibilidade de perda de potência do inseticida, somando ações de remoção de criadouros.

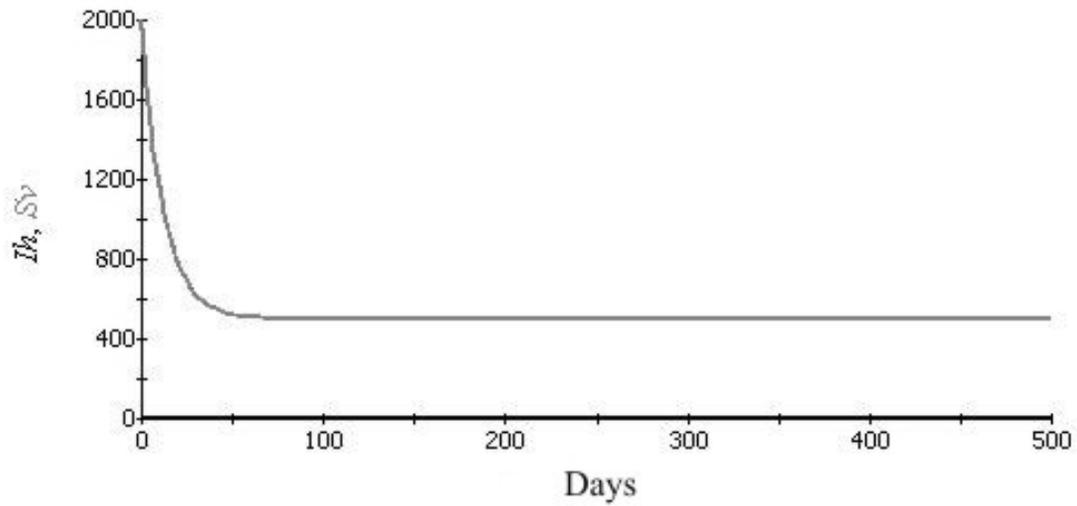


Figura 2. Cenário para transmissão da dengue na ausência da dengue, aplicação de 0% de controle nos estágios larval e adulto do vetor. Hospedeiros infecciosos I_h e Vetor infeccioso I_v .

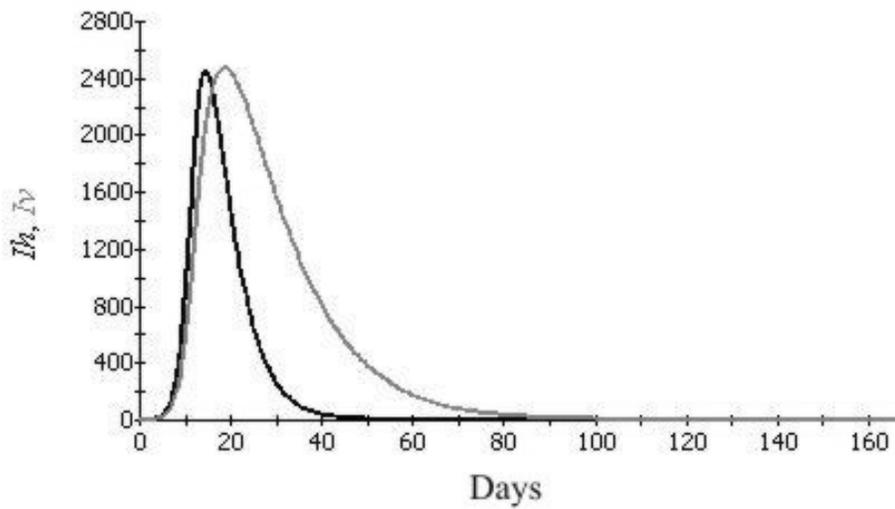


Figura 3. Cenário para transmissão da dengue simulando aplicação de 0% de controle nos estágios larval e adulto. Hospedeiros infecciosos I_h e Vetor infeccioso I_v .

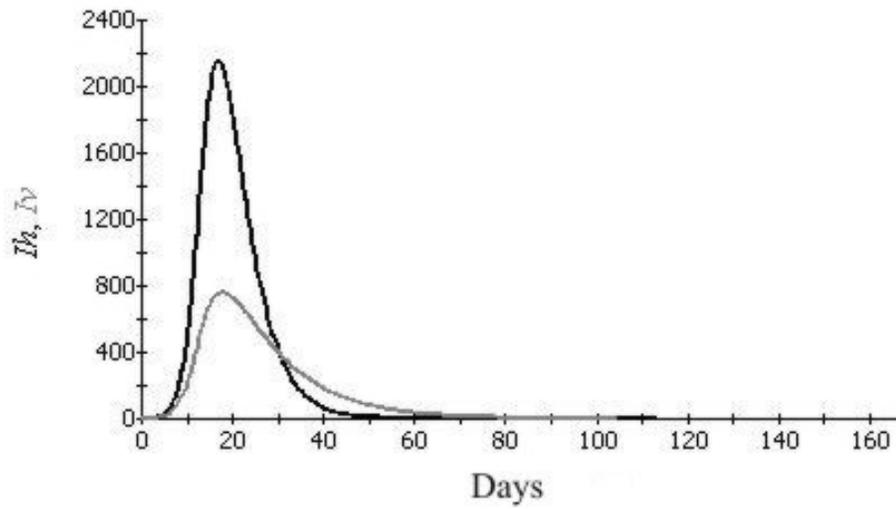


Figura 4. Cenário para transmissão da dengue simulando aplicação de 100% de controle nos estágios larval e adulto. Hospedeiros infecciosos I_h e Vetor infeccioso I_v .

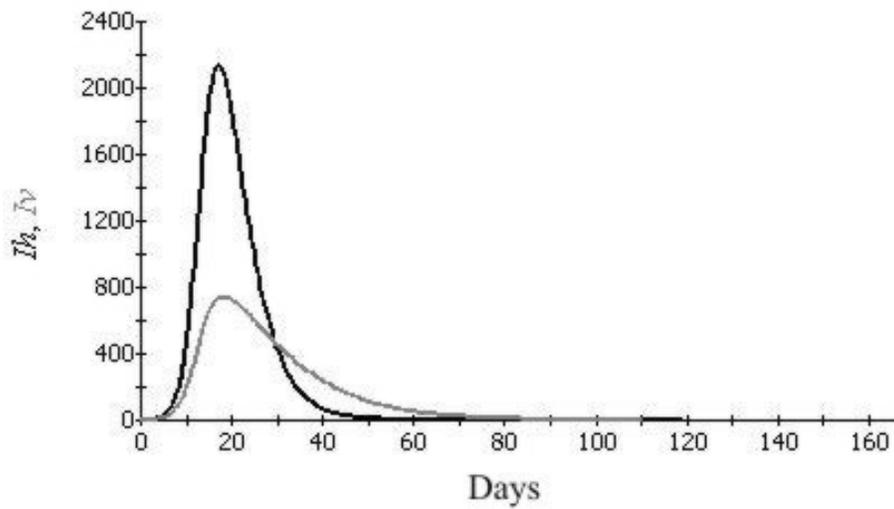


Figura 5. Cenário para transmissão da dengue simulando aplicação de 100% de controle nos estágios adulto e larval 0%. Hospedeiros infecciosos I_h e Vetor infeccioso I_v .

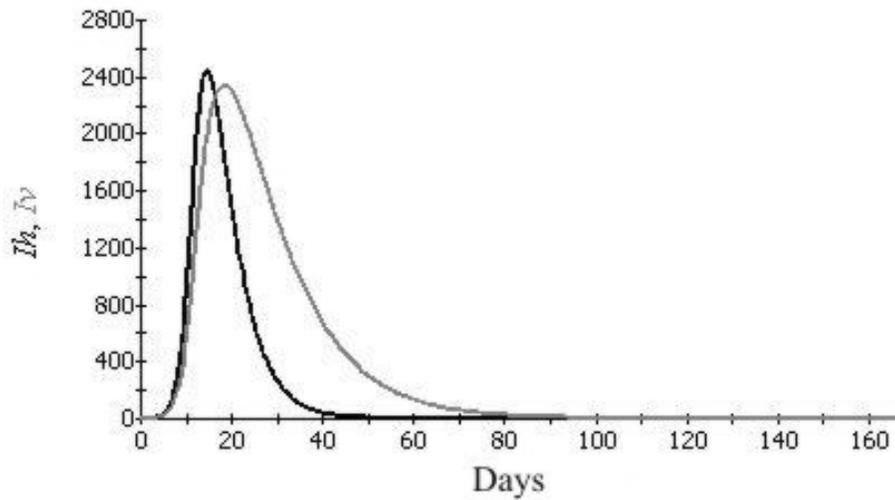


Figura 6. Cenário para transmissão da dengue simulando aplicação de 0% de controle nos estágios adulto e larval 100%. Hospedeiros infecciosos I_h e Vetor infeccioso I_v .

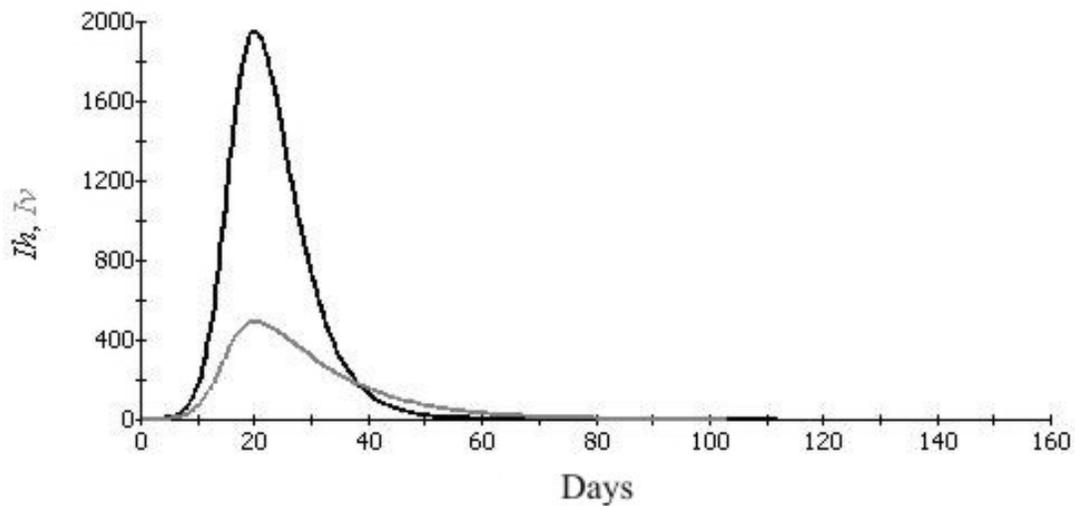


Figura 7. Cenário para transmissão da dengue simulando aplicação de 100% de controle no estágio adulto e considerando uma perda de efetividade do inseticida larvário de 30%. Hospedeiros infecciosos I_h e Vetor infeccioso I_v .

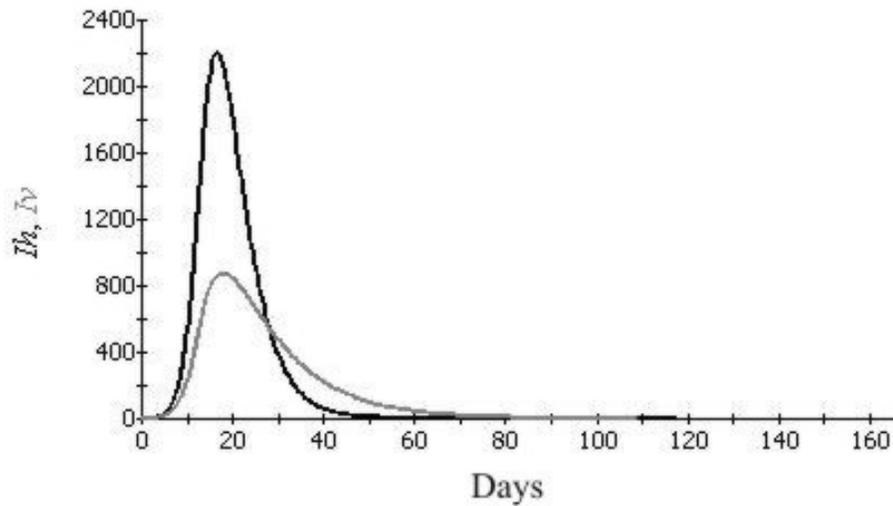


Figura 8. Cenário para transmissão da dengue simulando perda de efetividade de 20% de controle no estágio adulto e considerando uma perda de efetividade do inseticida larvário de 30%. Hospedeiros infecciosos I_h e Vetor infeccioso I_v .

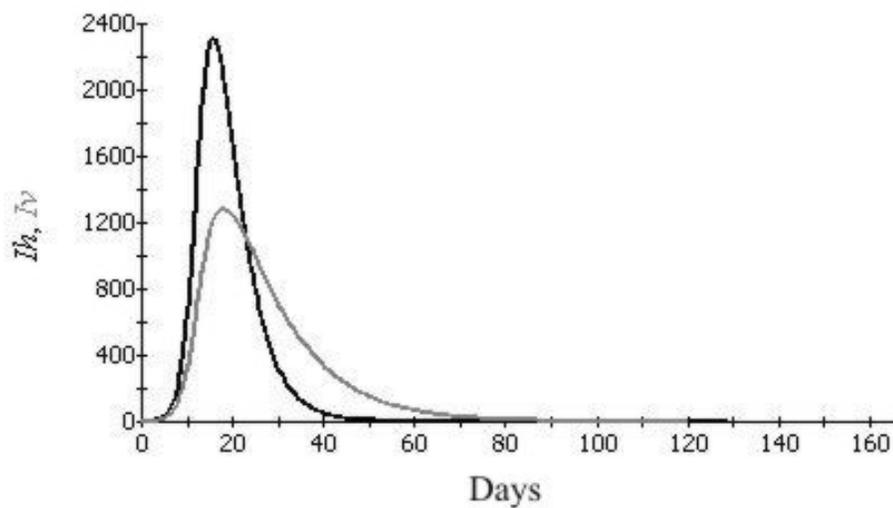


Figura 9. Cenário para transmissão da dengue simulando perda de efetividade de 50% de controle no estágio adulto e considerando uma perda de efetividade do inseticida larvário de 30%. Hospedeiros infecciosos I_h e Vetor infeccioso I_v .

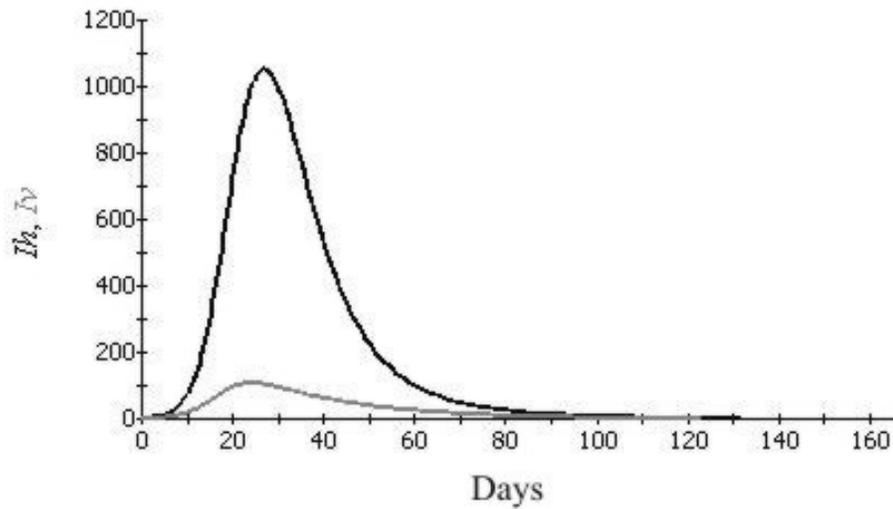


Figura 10. Cenário para transmissão da dengue simulando perda de efetividade de 20% de controle no estágio adultos e considerando uma perda de efetividade do inseticida larvário de 30%. Com uma população inicial de 5000 vetores. Hospedeiros infecciosos I_h e Vetor infeccioso I_v .

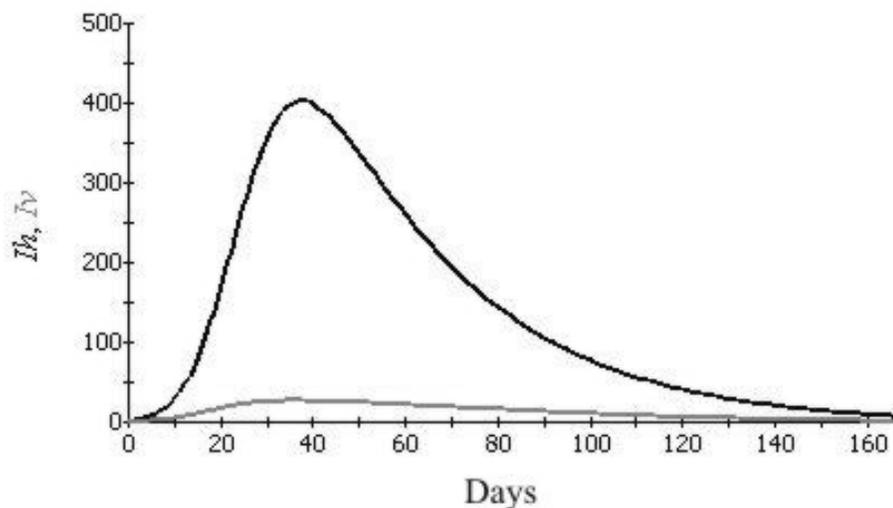


Figura 11. Cenário para transmissão da dengue simulando perda de efetividade de 20% de controle no estágio adulto e considerando uma perda de efetividade do inseticida larvário de 30%. Com uma população inicial de 2000 vetores. Hospedeiros infecciosos I_h e Vetor infeccioso I_v .

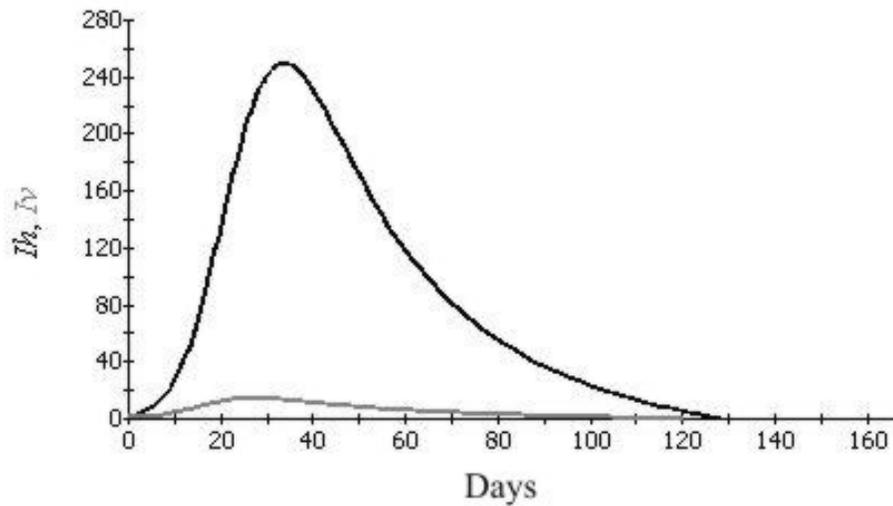


Figura 12. Cenário para transmissão da dengue simulando perda de efetividade de 10% de controle no estágio adulto e considerando uma perda de efetividade do inseticida larvário de 10%. Com uma população inicial de 2000 vetores. Hospedeiros infecciosos I_h e Vetor infeccioso I_v .

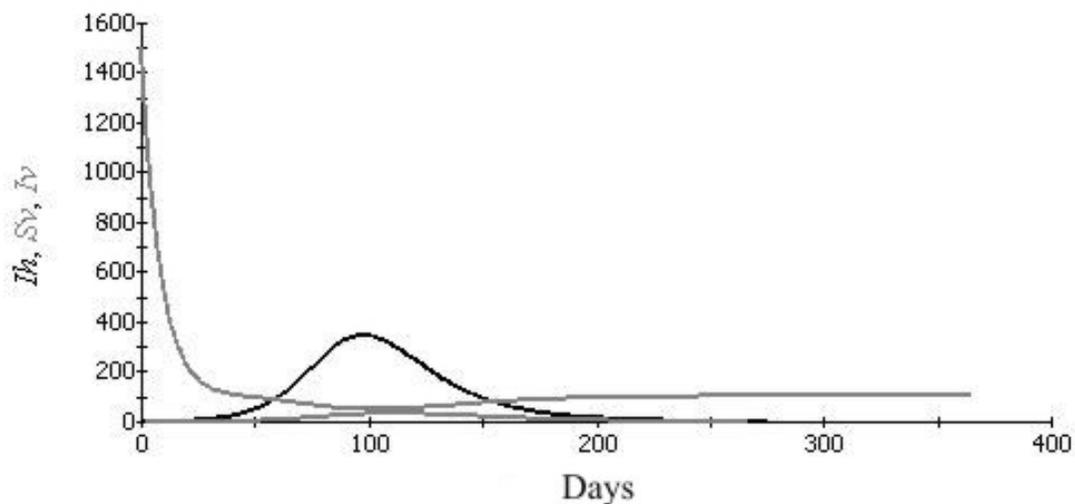


Figura 13. Cenário para transmissão da dengue simulando perda de efetividade de 65% de controle no estágio adulto e considerando uma perda de efetividade do inseticida larvário de 30%. Com uma população inicial de 1500 vetores. Hospedeiros infecciosos I_h e Vetor infeccioso I_v .

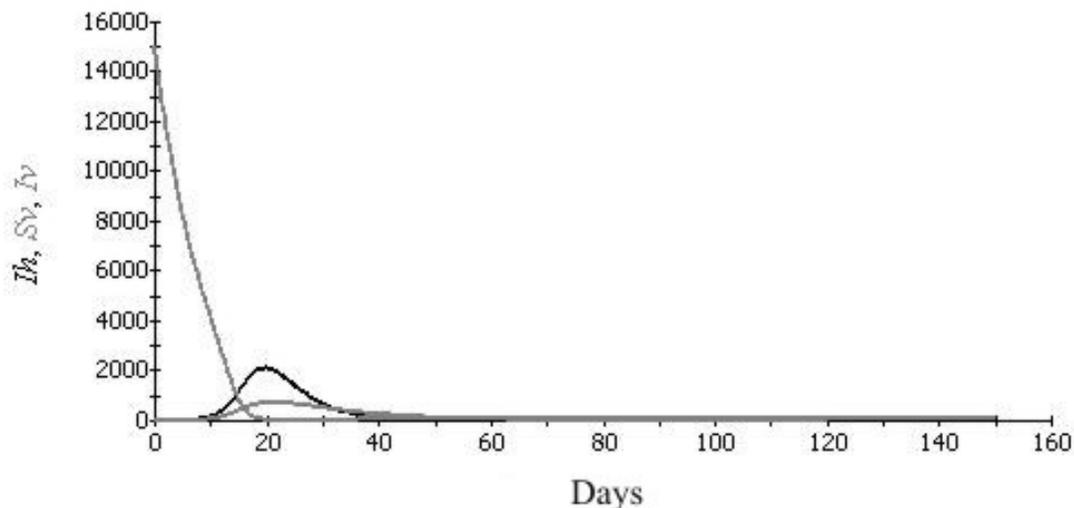


Figura 14. Cenário para transmissão da dengue simulando perda de efetividade de 65% de controle no estágio adulto e considerando uma perda de efetividade do inseticida larvário de 30%. Com uma população inicial de 15000 vetores. Hospedeiros infecciosos I_h e Vetor infeccioso I_v .

5.6. DISCUSSÃO

A inclusão dos parâmetros (w) e (Y) no modelo de Newton & Reiter (1992) abre a possibilidade de analisar e prever circunstâncias relacionadas com aplicação de tratamentos diferenciados a larvas e adultos do vetor *Aedes aegypti* e seu efeito na epidemia da dengue. Assim, como a medição do impacto das possíveis combinações destas variáveis na redução do vetor e sua influência na redução dos casos da dengue. Outros aspectos podem ser também analisados no modelo, como as falhas no controle do vetor, causadas pela resistência química e baixa cobertura das aplicações de inseticidas.

Outro aspecto a salientar, é que os parâmetros destinados ao controle de larvas (w) e adultos (Y) são considerados como a somatória de vários eventos. Uma vez que um controle efetivo do vetor depende da resistência química a inseticidas, efetividade de cobertura das aplicações dos inseticidas no ambiente e as ações

permanentes da comunidade no controle de criadouros do vetor. A falha de algum destes parâmetros, indiscutivelmente, compromete as ações realmente efetivas de controle do vetor, como observado na simulação do modelo. Dentro desta lógica, não é adequado aplicar inseticida totalmente efetivo, seja direcionado ao estágio adulto ou larvário, se seu emprego não está cobrindo a totalidade de criadouros ou indivíduos, seria similar à aplicação de inseticida em indivíduos resistentes, não causando a mortalidade esperada.

Está comprovada que nas aplicações de inseticidas Ultra baixo volume, a porcentagem de mosquitos atingida é afetada por fatores como o refúgio das fêmeas e migração a outros lugares (Perich *et al.* 2000; Castro *et al.* 2007). Desta forma, o controle integrado do vetor, para ser efetivo, deve apresentar combinação ideal de estratégias, como indicado no modelo em relação à cobertura das ações. No entanto, pode ser que este seja um evento dificilmente controlável nas aplicações de adulticidas.

Assim como Burattini *et al.* (2007) afirmam, observamos, com a simulação do modelo, que uma redução mais expressiva da doença é alcançada rapidamente com a redução dos mosquitos no estágio adulto, quando comparada apenas com tratamentos destinados ao controle dos estágios larvais do vetor. Isto alerta para necessidade de evitar inseticidas com perda de potência ou resistentes para utilização no estágio adulto, como já detectado para os piretróides como a cipermetrina em Cuba (Rodríguez *et al.* 1999) e Brasil (Duque *et al.* 2004 e Cunha *et al.* 2005) e deltametrina no Peru (Chávez *et al.* 2005) que comprometam o controle.

Como mostrado nas simulações do modelo, num evento epidêmico, a quantidade de indivíduos inicial é crucial na intensidade e redução rápida da epidemia. Talvez isto seja o que acontece nas ondas epidêmicas. Normalmente,

numa epidemia as ações de controle são aplicadas com veemência na tentativa de frear o aparecimento de mais indivíduos infecciosos, até conseguir em teoria o controle da doença. Posteriormente, se observa um recesso epidêmico e posteriormente um surto igual ou muito maior que o anterior (Capítulo I, correspondente a 2002-2003, 2004 a 2007). Isto é consequência do impacto sobre as populações dos vetores, que estão sujeitas a períodos de menor intensidade de controle, permitindo a dispersão e o aumento populacional.

Finalizando, segundo as simulações do modelo, a relação densidade vetor - hospedeiro, é fundamental para o êxito dos programas de controle. Isto alerta para a necessidade urgente de implantação de metodologias de vigilância entomológica que permitam detectar rapidamente a presença do vetor, uma vez que a única forma de evitar a dengue é impedir a coexistência do hospedeiro e vetor. Dentro de estas estratégias, consideramos que é urgente incluir nos programas de controle outros métodos complementares como armadilhas de oviposição que são mais sensíveis à presença da atividade do vetor, e armadilhas para captura das fêmeas grávidas.

5.7. Conclusões

A inclusão de (w) e (Y) no modelo de Newton & Reiter (1992), abrem a possibilidade de analisar e prever circunstâncias relacionadas com aplicação de tratamentos diferenciados a larvas e adultos do vetor *A. aegypti* e seu efeito na epidemia da dengue.

A falha de algum destes parâmetros indiscutivelmente compromete as ações realmente efetivas de controle do vetor.

Evitar inseticidas resistentes para utilização nos estágios adultos.

5.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alstad D. 2005. **Populus Java Version 5.4**. Department of ecology, Evolution & Behavior. University of Minnesota. Consultado em agosto 2007 .www.Cbs.umn.edu/populus/.
- Beserra, E.B.; Fernandes, C.R.M.; Queiroga, M.F.C & Castro, F.P.Jr. 2007. Resistência de populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefós na Paraíba. **Neotropical Entomology 36**: 303-307.
- Braga, I.A.; Lima, J.B.P.; Soares, S.S & Valle, D. 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 99**: 199-203.
- Burattini, M. N.; Chen, M.; Chow, A.; Coutinho, F.A. B.; Goh, K.T.; Lopez, L.F.; Ma, S.; Massad,. 2007. Modelling the control strategies against dengue in Singapore. **Epidemiol. Infect.** 1 - 11.
- Campos, J & Andrade, C.F.S. 2001. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticida químicos. **Revista de Saúde Pública 35**: 232-236.
- Carvalho, M.S.L.; Caldas, E.D.; Degallier, N.; Vilarinhos, P.T.R.; Souza, L.C.K.; Yoshizawa, M.A.C.; Knox, M.B & Oliveira, C. 2004. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to the insecticide temephos in the Federal District, Brazil. **Revista de Saúde Pública 38**: 623-629.
- Castro, M.; Quintana, N & Quiñonez, M.L.P. 2007. Evaluación de dos piretroides en el control del vector del dengue en Putumayo, Colombia. **Revista de Salud Publica 9**: 106-116.

- Cunha da M P, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE & Valle D. 2005. Monitoring of resistance of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **100**: 441-444.
- Chávez JCG, Roldán JR & Vargas FV. 2005. Niveles de resistencia a dos insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del Perú. **Revista Colombiana de Entomología** **31**:75-78.
- Derouich M, Boutayeb A & Twizell E. H. 2003. A model of dengue fever. *BioMedical Engineering OnLine*. 2: 1-10. Consultado em agosto 2007: www.biomedical-engineering-online.com/content/2/1/4.
- Derouich M & Boutayeb A. 2006. Dengue fever: mathematical modelling and computer simulation. **Applied Mathematics and Computation** **177**: 528-544.
- Duque, J.E.L.; Martins, F.M.; Anjos, F.A.; Kuwabara, E.F & Navarro-Silva, M.A. 2004. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas Temephos e Cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. **38**: 842-843.
- Esteva L & Vargas C. 2000. Influence of vertical and mechanical transmission on the dynamics of dengue disease. **Mathematical Biosciences** **167**: 51-64.
- Gubler D J. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews** **11**: 480-496.
- Hasting A. 1997. **Population Biology. Concepts and Models**. Springer-Verlag. New York, Inc. 220 pp.
- Jelinek T. 2000. Dengue fever in international travelers. **Clinical Infectious Diseases** **31**: 144-147.
- Joshi, V.; D.T. Mourya & R.C. Sharma 2002. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti*

- mosquitoes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 67: 158-161.
- Kroeger A & Nathan M.B. 2006. Dengue: setting the global research agenda. **The Lancet** **368**: 2193-2195.
- Lima, E.P.; Oliveira, A.M.F.; Lima, J.W.O.; Ramos, A.N.J.; Cavalcanti, L.P.G & Pontes, R.J.S. 2006. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **39**: 259-263.
- Lima, J.B.P.; Pereira da Cunha, M.; Silva-Jr, R.C.S.; Galardo, A.K.R.; Soares, S.S.; Braga, I.A.; Ramos, R.P & Valle, D. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine And Hygiene** **68**: 329-333.
- Macoris, M.L.G.; Andrighetti, M.T.; Takaku, L.; Glasser, C.M.; Garbeloto, V.C & Cirino, V.C.B. 1999. Alterações de resposta de susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública** **33**: 521-2.
- Macoris, M.L.G.; Andrighetti, M.T.; Takaku, L.; Glasser, C.M.; Garbeloto, V.C & Bracco, J.E. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to Organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **98**: 703-708.
- Newton E.A.C & Reiter P. 1992. A model of the transmission of dengue fever with an evaluation of the impact of ultra-low volume (ULV) insecticide applications on dengue epidemics. **American Journal of Tropical Medicine And Hygiene** **47** : 709-720.

Periago M.R & Guzmán M.G. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas.

Rev. Panam. Salud Publica/Pan Am J Public Health 21:187-191.

Perich M.J, Davila G, Turner A, Garcia A & Nelson M. 2000. Behavior of resting

Aedes aegypti (Culicidae:Diptera) and its relation to ultra-low volume adulticide

efficacy in Panama City, Panama. **Journal of Medical Entomology 37: 541-**

546.

Rodríguez M M, Bisset JA, Milá LH, Calvo E, Diaz C & Soca L A. 1999. Niveles de

resistencia a insecticidas y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de

Santiago de Cuba. **Revista Cubana de Medicina Tropical 51: 83-88.**

6. CONCLUSÃO GERAL DA TESE

As evidências mostram que a dengue no estado do Paraná é um fenômeno crescente e inevitável, havendo a necessidade de revalidação das metodologias atuais de controle. Pode-se esperar apenas, a diminuição dos casos desta doença por curtos períodos de tempo, que após um recesso na intensidade das atividades de controle do vetor, este se estabelece novamente determinando a ocorrência de ondas epidêmicas reincidentes do ciclo epidêmico. Diante deste cenário, a única possibilidade atual para diminuição da dengue está no controle do vetor. É primordial manter a vigilância alerta aos seguintes pontos: 1) Monitoramento da dispersão e aumento populacional do vetor mediante avaliação permanente dos índices que indicam a presença do vetor, que devem permanecer próximos a zero e 2) intensificação da avaliação da resistência, não apenas para o temefós, mas também de adulticidas. Embora, nos municípios onde ocorreu avaliação da susceptibilidade ao temefós, acusassem a resistência de *Aedes aegypti*, esta foi baixa, não sendo relacionada ao incremento dos casos. A falha de vigilância entomológica pode resultar em epidemias com intensidade superior às experimentadas atualmente.

7. Anexo

(Protocolo de diluição do inseticida sugerido)

Para preparar o inseticida em nosso laboratório seguimos um protocolo ligeiramente modificado ao original da WHO. Encontrar uma forma detalhada deste processo nos artigos é quase impossível, devido à disponibilidade de materiais necessários para calibrar os inseticidas. Esclarecido isto, segue o protocolo utilizado em nosso laboratório:

1. Primeiramente, você deve conhecer a concentração do produto informada pelo fabricante (preferivelmente em grau técnico). Exemplo: Temefós solução líquida de 90%.
2. Deve fazer a curva de calibração do inseticida com a colônia referência *Aedes aegypti* Rockfeller (Rock), para estabelecer a concentração diagnóstico e utilizar (CD) conforme mencionado no capítulo I.
3. Para isto, é necessário preparar uma bateria de concentrações que causem mortalidade entre 1 e 99% na colônia Rock.
 - a) Neste caso deve-se levar em conta que esta colônia é 100% susceptível e as concentrações desta linhagem são, geralmente, menores que as de populações de campo. Nós utilizamos uma faixa de concentrações de 0.0048 a 0.0013 (ppm ou mg/L), que já estabelecemos previamente em laboratório e sempre incluímos 0.0125 (ppm ou mg/L), observe que a 0.0125 é uma CD recomendada pela OMS. Como o inseticida que utilizamos é o temefós 90%, é necessário fazer cálculos para transformar em partes por milhão (ppm ou mg/L). A densidade deste produto segundo o fabricante é de **0,965 g/mL**. Ou,

seja tem que fazer um fator de conversão: Assim, 90 g (temefós)/100 g (solução-volume) * **0,965 g/mL** = 0,8685 g/mL (densidade do temefós a 90%).

b) Transformando de g/mL a ppm ou mg/Kg; temos que o temefós está a 0,8685 g/mL * 1 000 mL/1L * 1 000 mg/1g = 868 500 mg/Kg ou ppm.

c) Desta forma sabemos que 868 500 mg/L é igual que ter 868500 ppm.

4. Como já sabemos que o produto a ser avaliado está a 868500 ppm ou mg/L, pode-se planejar a bateria de concentrações comentada no ponto (3). Dependendo da colônia Rockefeller utilizada (CDC, Borabora ou outra), como observados em diferentes artigos, obter-se á diferentes CL₅₀. Este valor é importante porque serve como referência para ter uma idéia das concentrações que devem ser estabelecidas. Na atualidade, em nossos experimentos estamos utilizando as seguintes concentrações 0.0125, 0,0048; 0,0030; 0,0027; 0,0024; 0,0016; 0,0015; 0,0013; 0,0018 ppm para a colônia Rockefeller (colônia brasileira).
5. Para preparar as concentrações anteriores, utilizamos o seguinte modelo, que também pode ser empregado para preparar as concentrações para outras colônias diferentes (localidades x):
 - a) Como o temefós está em grau técnico e muito concentrado, deve-se diluir, a concentrações fáceis de manipulação (com micropipetas). Inicialmente preparar uma solução estoque: volume recomendado 2 mL em um ependorff (inseticida + etanol) de solução a 3000 ppm. Esta solução deve ser preparada para ser utilizada no máximo por 30 dias, e deve ser preservada a temperatura de 4°C. Utiliza-se a seguinte

fórmula $V_1C_1=V_2C_2$. Onde, V = volume, C = Concentração. Exemplo, $2000 \mu\text{L}$ (inseticida + etanol) * 3000 ppm (contração desejada) = V_2 (volume que deve ser usado do inseticida grau técnico a 90%)* 868 500 ppm (concentração do temefós). Isto é = 6,908 μL aproximando a 7 μL . Este volume é o que deve ser tomado do produto original temefós 90%, logo completar com etanol 1993 μL , totalizando 2000 μL em ependorff (etanol + inseticida). Nosso preparado estará finalmente a 3000 ppm.

- b) A solução de 3000 ppm será utilizada para preparar as concentrações diárias (preparadas unicamente para cada experimento) mencionadas em (4). Como exemplo; se prepara um volume de etanol + inseticida, suficientes para as concentrações e as repetições, numa concentração diluída de 6 ppm. Geralmente, preparamos 40 μL deste preparado a um volume de 20 mL (ver (d)), que é suficiente para testar duas populações “x” além da colônia Rockfeller. Isto varia dependendo do número de populações que serão avaliadas.
- c) Para o passo seguinte, deve ter em conta o volume do pote (copo) que será utilizado como meio para fazer os experimentos, assim deve-se preparar uma solução estoque anterior, que seja suficiente para quatro réplicas por concentração.
- d) Como precisamos ter suficiente preparado do inseticida, para testar a colônia “x” avaliada paralelamente com a colônia referência (Rock). Utilizamos novamente a fórmula $V_1C_1=V_2C_2$; onde, $3000 \text{ ppm} * C_1 = 6 \text{ ppm} * 20\ 000 \mu\text{L}$ (preparado necessário, para 8 concentrações de quatro réplicas para Rock e colônia “x”). O resultado é que temos que

tomar 40 µL da solução estoque de 3000 ppm. Em um tubo de centrífuga hermético, colocar 19960 µL de etanol + 40 µL da solução de temefós a 3000 ppm, a solução final estará então a 6 ppm.

- e) Agora que temos uma solução preparada de 20 mL = 20 000 µL a 6 ppm, com esta solução prepararemos as concentrações a avaliar de 0.0125, 0,0048; **0,0030**; 0,0027; 0,0024; 0,0016; 0,0015; 0,0013; 0,0018 ppm (estas concentrações podem variar se utiliza uma colônia Rock como controle diferente).
- f) Temos que diluir novamente para fazer o teste em potes plásticos (em nossos experimentos utilizamos um volume de 200 mL). Então, $V_1C_1=V_2C_2$. Assim 200 000 µL (volume de água utilizada no experimento) * **0,0030 ppm** = $V_2 * 6$ ppm. Logo tomamos da solução diária a 6 ppm, um volume de 100 µL. Que estará a 0.0030 ppm. Desta forma, pode saber-se quanto utilizar da solução para ter a concentração desejada. Se necessário, pode aumentar as concentrações com a mesma fórmula.
- g) Para cada concentração desejada deve-se fazer o mesmo cálculo.
- h) Todo o processo de preparação das concentrações deve ter uma agitação homogênea, recomendamos utilizar um Vortex por 30 segundos.

6. Finalmente, se você vai colocar um volume de 100 µL (0.0030 ppm) no pote de experimento (com as larvas a testar) deve tirar o mesmo volume de água do pote, e só depois colocar os 100 µL de inseticida. Pode, também, fazer os

cálculos, para deixar um volume fixo de 500 μL (este, é recomendado, porém pode variar dependendo das micropipetas), assim:

- a) O volume de água, que deve tirar dos potes, Volume da a mostra = 500 μL (etanol + temephos), assim 100 μL (Volume temephos) + 400 μL de etanol.
- b) Aplica a fórmula, $V_1C_1=V_2C_2$, 6 ppm* $C_1 = 0.0048$ ppm (concentração maior) * 200 000 μL . Assim, teremos um valor 160 μL que se completara com 340 μL de etanol, somando 500 μL etanol + inseticida.
- c) Para cada concentração desejada deve-se fazer o mesmo cálculo.

Ter em conta que para populações coletadas em campo diferentes de Rock, no caso destas serem resistentes, naturalmente as concentrações serão maiores. Assim, que deve ser realizada uma bateria de concentrações que permitam determinar a mortalidade entre 1 e 99%.