



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Especialização em Entomologia Médica

Edgar Lorenzo Sanabria Garayo

Orientadora:
MSc. Luciana dos Santos Dias

Rio de Janeiro
2019

Edgar Lorenzo Sanabria Garayo

Avaliação da susceptibilidade a inseticidas de mosquitos *Aedes*
(*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) do
município de Pedro Juan Caballero, Paraguai

Monografia submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de especialista em
Entomologia Médica, Curso de Especialização
em Entomologia Médica, pelo Instituto
Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Rio de Janeiro

Data: ___/___/___

Assinatura do Aluno

Assinatura do Orientador

Assinatura do 2º Orientador (opcional)

Sanabria Garayo, Edgar Lorenzo.

Avaliação da susceptibilidade a inseticidas de mosquitos *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) do município de Pedro Juan Caballero, Paraguai / Edgar Lorenzo Sanabria Garayo. - Rio de Janeiro, 2019.

31 f.

Monografia (Especialização) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Entomologia Médica, 2019.

Orientadora: Luciana Dias.

Bibliografia: f. 22-29

1. *Aedes aegypti*. 2. resistência. 3. temefós. 4. deltametrina. 5. malation.
I. Título.

RESUMO DO PROJETO

A primeira epidemia de dengue registrada no Paraguai aconteceu em 1988. A partir de 2015 foram introduzidas outros arbovírus como chikungunya e Zika. O Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo (SENEPA), subordinado ao Ministério da Saúde Pública e Previdência Social, é responsável pela vigilância entomológica e controle do vetor *Aedes aegypti* nos 17 departamentos do país. A cidade de Pedro Juan Caballero apresenta uma história de mais de três décadas de uso de inseticidas como a única estratégia de controle de vetores. Atualmente não há informações sobre a resistência da população de Pedro Juan Caballero aos inseticidas utilizados. Este trabalho tem como objetivo fornecer dados sobre a suscetibilidade de *Aedes aegypti* ao larvicida temefós e a determinação da frequência de resistência fenotípica aos adulticidas deltametrina e malation. A coleta de ovos foi realizada em todos os bairros da cidade em uma amostra aleatória de residências. Os ovos coletados foram levados para o laboratório de entomologia do SENEPA para contagem, eclosão e criação até a geração F1. Os bioensaios para larvas com temefós foram realizados com base no protocolo da Organização Mundial da Saúde. Bioensaios de garrafas para mosquitos adultos fêmeas foram conduzidos seguindo o protocolo do CDC para deltametrina e malation. A população de *Aedes aegypti* da cidade de Pedro Juan Caballero, apresentou baixa resistência ao temefós (RR95: 3,18). Nos bioensaios com mosquitos adultos (detecção da frequência fenotípica de resistência) a população de *Aedes aegypti* de Pedro Juan Caballero apresentou resistência ao inseticida deltametrina (84% de mortalidade aos 30 minutos de exposição) e suscetibilidade ao inseticida malation (100% de mortalidade em 30 minutos de exposição). Estes resultados serão fundamentais para a tomada de decisão quanto ao uso de inseticidas na cidade de Pedro Juan Caballero pelos responsáveis dos programas de controle do vetor.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, resistência, temefós, deltametrina, malation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
O mosquito <i>Aedes aegypti</i>	1
Dengue	3
Febre Amarela Urbana	4
Chikungunya	5
Zika	6
Controle Vetorial.....	7
2. OBJETIVO GERAL	11
3. OBJETIVO(S) ESPECÍFICO(S).....	11
4. METODOLOGIA	11
Amostragem	11
Coleta de ovos	12
Criação dos mosquitos de campo em laboratório.....	13
Inseticidas.....	14
Bioensaios	15
Análises estatísticas.....	14
Considerações éticas	15
5. RESULTADOS	15
6. DISCUSSÃO.....	19
7. CONCLUSÕES.....	22
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
9. ANEXOS.....	30
Anexo 1: Termo de consentimento livre e esclarecido para a coleta de ovos nos bairros de Pedro Juan Caballero	30
Anexo 2: Aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais – CEI Laboratorio central de Salud Publica	31

1. INTRODUÇÃO

Os mosquitos da espécie *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) são vetores de diversas arboviroses, como a dengue, a febre amarela urbana, a Zika e o chikungunya (BARNETT, 2007; POWELL & TABACHNICK, 2013; WEAVER & LECUIT, 2015, PETERSEN et al, 2016; BUENO, 2017). Estas arboviroses representam um grave problema em saúde pública e podem afetar negativamente a economia da região atingida (GUBLER, 1997; CORONEL et al, 2016). O *Ae. aegypti* é cosmopolita, com alta frequência em ambientes urbanos, com elevada densidade populacional humana, grande concentração de casas e baixa cobertura vegetal, e tem comportamento endofílico (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Um grande problema associado a este vetor é a capacidade de fazer ingestões múltiplas de sangue durante um único ciclo gonotrófico o que amplia a possibilidade do *Ae. aegypti* se infectar e transmitir esses arbovírus a humanos (TEIXEIRA et al, 1999).

O mosquito *Ae. aegypti*

Os mosquitos pertencem ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Diptera, família Culicidae. O clima é um dos fatores relacionados com a distribuição do *Ae. aegypti*. Essa espécie é mais abundante em regiões tropicais e subtropicais, principalmente entre as latitudes 35°N e 35°S (WHO, 2009). A presença humana é fator primordial na distribuição desse vetor, já que se trata de espécie altamente sinantrópica que aproveita os criadouros artificiais produzidos pelo homem para sua reprodução (PONLAWAT & HARRINGTON, 2005; JANSEN & BEEBE, 2010).

O desenvolvimento pós-embriônico dá-se por holometabolismo, isto é, metamorfose completa, com ciclo biológico dividido em quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto, sendo o estágio larvário subdividido em quatro estádios (L1, L2, L3 e L4). Após a eclosão do ovo registram-se cinco ecdises, quatro larvais e uma pupal, e posteriormente a emergência de indivíduos adultos (FORATTINI, 2002).

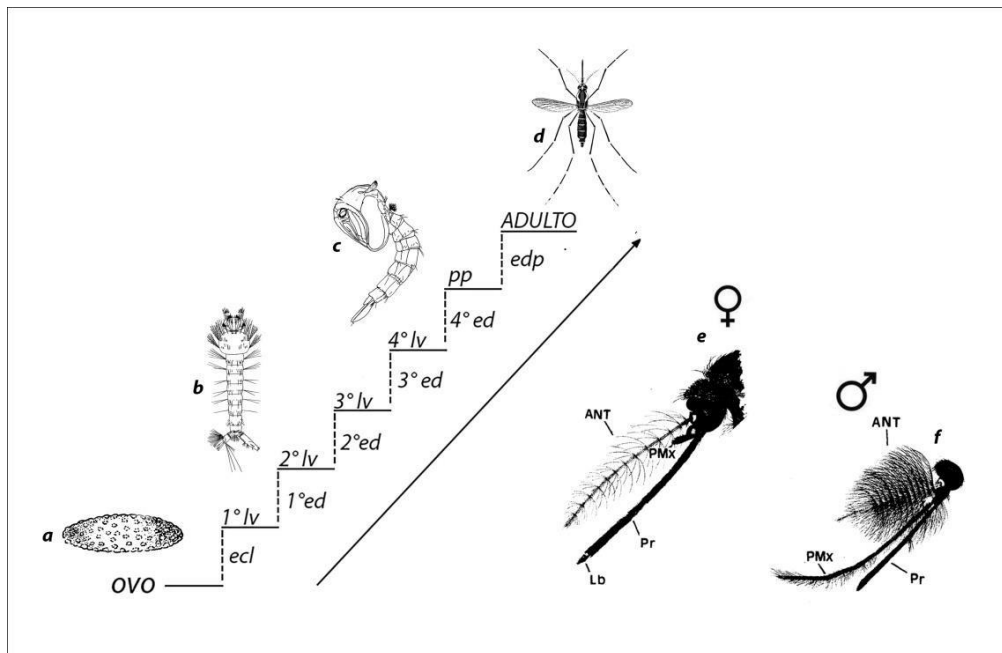


Figura 1: Desenvolvimento Holometabólico de culicídeo e dimorfismo sexual. a: ovo; b: larva; c: pupa; d: mosquito adulto; ecl: eclosão; ed: ecdise larval; edp: ecdise pupal; lv: estágio larval; pp: estágio pupal; e: Fêmea adulto, cabeça vista lateral; f: Adulto macho, cabeça vista lateral; ANT: antena; PMx: palpo maxilar; Pr: probóscide; Lb: labela. Fonte: Caldeira, 2016.

Os adultos do *Ae. aegypti* representam a fase reprodutora do inseto e, por serem alados, é nessa fase que ocorre a dispersão da espécie (FUNASA – Fundação Nacional de Saúde, 2001). Os mosquitos *Ae. aegypti* possuem em seu corpo características de fácil identificação (Figura 2): escamas brancas alternadas com escuras, escudo recoberto por escamas escuras e um desenho em forma de lira composto por escamas branco-prateadas (REY, 2008).



Figura 2: Adulto de *Ae. aegypti* (fêmea) cujo corpo é recoberto por escamas pretas e brancas. Fonte: Genilton Vieira/IOC.

Apesar de possuir certo ecletismo com relação a sua fonte sanguínea o *Ae. aegypti* realiza hematofagia principalmente em seres humanos (TAUIL, 2001). Seus hábitos são diurnos, porém é oportunista e pode, esporadicamente, realizar hematofagia em qualquer horário. As fêmeas são muito ariscas e vorazes e por isso, quando importunadas fogem podendo retornar para picar o mesmo hospedeiro ou ainda outro indivíduo em um único ciclo gonotrófico. São capazes de se infectar e transmitir diversas arboviroses para os humanos como dengue, Zika, febre amarela urbana e Chikungunya.

Dengue

A dengue é uma doença febril aguda, sistêmica, cujo agente etiológico é um arbovírus do gênero *Flavivirus*, pertencente à família Flaviviridae com quatro sorotipos conhecidos denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e recentemente foi identificado o DENV-5 (FIGUEIREDO, 2000; TAUIL, 2001; MUSTAFA et al, 2015). É comum em mais de cem países em todo o mundo (Figura 3), cerca de quarenta por cento da população mundial – aproximadamente três bilhões de pessoas - vive em áreas de risco de transmissão dessa arbovirose (Centers for Disease Control and Prevention - CDC, 2019a). O humano contaminado transmite o vírus dengue para a fêmea do vetor no momento do repasto sanguíneo, após o período de incubação intrínseca do vírus (5 a 6 dias). A fêmea infectada pode transmitir o vírus dengue a humanos saudáveis através da picada após o período de incubação extrínseca (cinco a 12 dias) por toda sua vida. A transmissão do vírus dengue não ocorre pelo contato direto de pessoa para pessoa (BRASIL, 2009). Aproximadamente 400 milhões de pessoas são infectadas pelo vírus dengue anualmente levando a gastos consideráveis por parte dos governos no tratamento desses doentes (CDC 2019a).

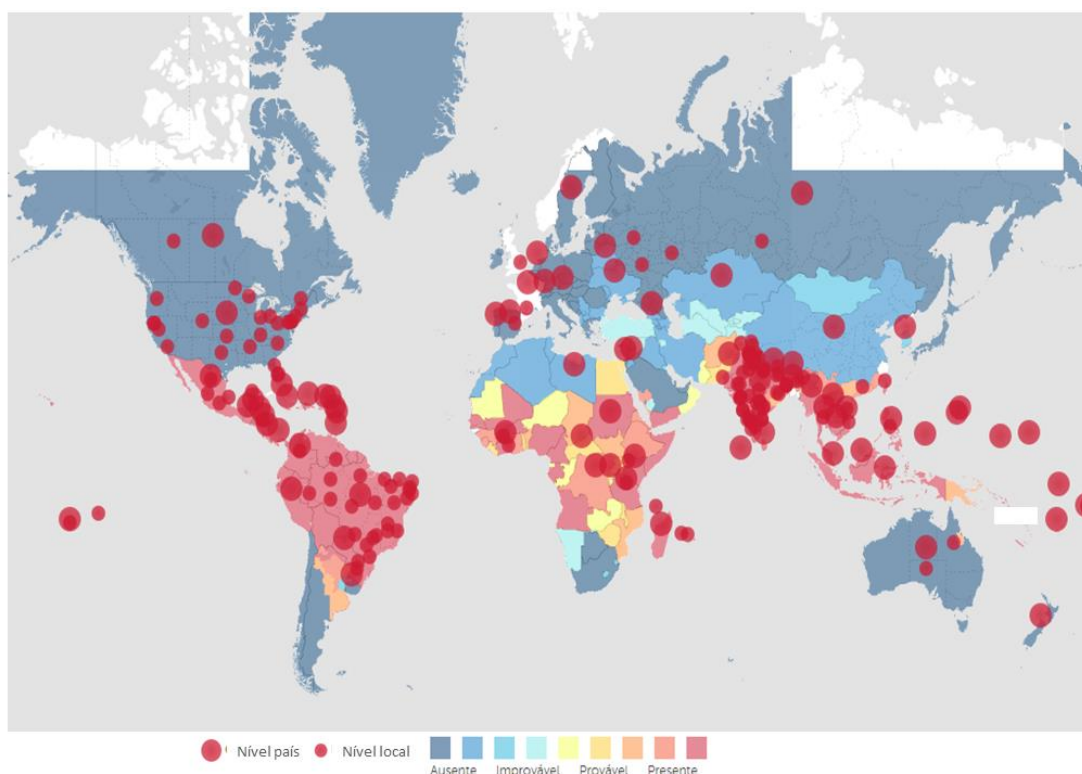


Figura 3: Dengue no mundo. Fonte: Adaptado de CDC, 2019 <https://www.healthmap.org/dengue/en/>

A primeira epidemia de dengue registrada no Paraguai ocorreu entre 1988 e 1989, com um total de 41.990 casos em todo o território (PARAGUAI, 2007). No ano de 2013, mais de 131 mil casos de dengue foram confirmados (PARAGUAI, 2013) e em 2018, foram registrados 32.359 casos compatíveis com dengue. No ano de 2019 até a semana epidemiológica N° 22 (30-12-2018 a 01-06-2019) houve 4.740 casos de dengue em 15 departamentos incluindo o departamento de Amambay e a cidade de Assunção (PARAGUAI, 2019).

Febre Amarela Urbana

É uma doença de etiologia viral, de curta duração (máximo 12 dias), não contagiosa, causada por um vírus do gênero *Flavivirus*, família Flaviviridae (BRASIL, 2009). O *Ae. aegypti* é o principal vetor tanto na América do Sul como na África (TAUIL, 2010). O vírus da febre amarela é transmitido para as pessoas principalmente através da picada de mosquitos do gênero *Ae.* ou *Haemagogus* infectados. Os mosquitos adquirem o vírus alimentando-se de primatas infectados (humanos ou não humanos) e então podem transmitir o vírus a outros primatas (humanos ou não humanos). As pessoas infectadas com o vírus da febre amarela são infecciosas aos mosquitos (referidos como “virêmicos”)

pouco antes do início e até 5 dias após o início (CDC, 2019b).

O ciclo urbano envolve a transmissão do vírus entre humanos e mosquitos urbanos, principalmente o *Ae. aegypti*. O vírus é geralmente trazido para o ambiente urbano por um humano virêmico infectado na selva ou na savana. Até o final do século XIX as ocorrências de epidemias de febre amarela urbana provocavam um caos na economia de um país, com prejuízo na produção, exportação e turismo (VASCONCELOS, 2003). Porém com o desenvolvimento de vacina eficaz no início de século XX muitas zonas da América Latina e do Caribe eliminaram casos de febre amarela urbana (SVS, 2004). Apesar disso, no ano de 2008, após 34 anos do último caso de febre amarela registrado no Paraguai, casos autóctones foram registrados no norte do país (OPAS, 2008; TAUIL, 2010). Acontecimentos como esse são preocupantes pois podem tomar grandes proporções e se tornar um sério problema de saúde pública.

Chikungunya

É uma doença viral, que é transmitida de pessoa a pessoa através da picada de mosquitos infectados, incluindo o *Ae. aegypti*, que se infectam ao picarem um humano infectado pelo vírus. Seus principais sintomas são febre alta, dores de cabeça, musculares e nas articulações, que costumam persistir por 7 a 10 dias; porém as dores nas articulações podem durar de semanas até um ano, por isso o nome chikungunya, que provém de um verbo na língua africana Kimakonde que significa "tornar-se contorcido", referindo-se à aparência "curvada" das pessoas que sofrem com dores nas articulações (CDC, 2019c; WHO, 2019). Como é possível observar na figura 4, diversos países do mundo estão na área de risco de transmissão dessa arbovirose. Em 2015, chikungunya chegou ao Paraguai com 4.294 casos em 9 dos 17 departamentos (Estados). Em 2018, foram registrados 1237 casos de chikungunya, principalmente nos bairros da cidade de Pedro Juan Caballero, já no ano de 2019, 40 casos foram identificados (PARAGUAI, 2018; PARAGUAI, 2019).

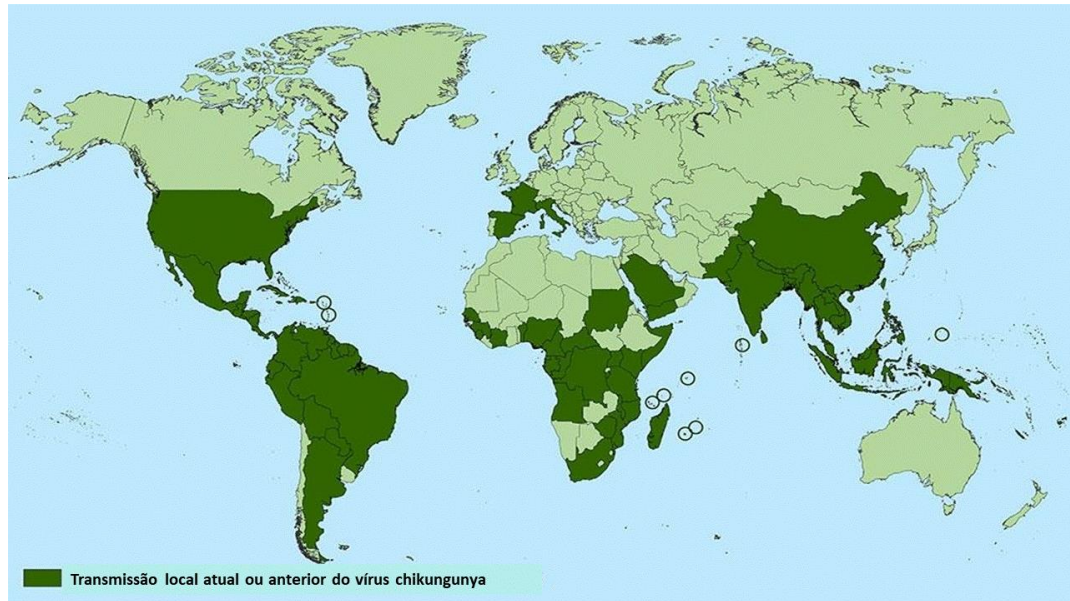


Figura 4: Distribuição dos países e territórios com casos de Chikungunya reportados até 29 de maio de 2018. Fonte: Adaptado de CDC, 2019 <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>

A doença não costuma ser fatal, porém mortes causadas direta ou indiretamente por ela já estão sendo reportadas. Até o momento não existe tratamento específico para a infecção por chikungunya, nem vacina para preveni-la, e a única forma eficaz de prevenção é manter a infestação do vetor abaixo dos limites de transmissão do vírus (PAHO, 2014; BRITO, 2017).

Zika

Zika é uma doença viral, causada por um *Flavivírus* e transmitida primariamente ao humano através da picada de mosquito (*Ae. aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1984)), ou através da relação sexual (WHO, 2019b; PAHO, 2019). Esse vírus foi identificado pela primeira vez em humanos em 1952 em Uganda e na República Unida da Tanzânia (PAHO, 2019).

Dos anos 1960 a 1980, casos esporádicos raros de infecções humanas foram encontrados em toda a África e Ásia, geralmente acompanhados por doenças leves. Após esse período primeiro surto registrado de doença do vírus Zika foi relatado na Ilha de Yap (Estados Federados da Micronésia) em 2007. Isto foi seguido por um grande surto de infecção pelo vírus Zika na Polinésia Francesa em 2013 e outros países e territórios no Pacífico. Em março de 2015, o Brasil registrou um grande surto de doença exantemática, logo identificado como infecção pelo Zika vírus, e em julho de 2015, associado à síndrome de Guillain-Barré e a microcefalia em recém nascidos (WHO,

2019b). Atualmente vários países do mundo estão na área de risco de infecção pelo Zika vírus (Figura 5).

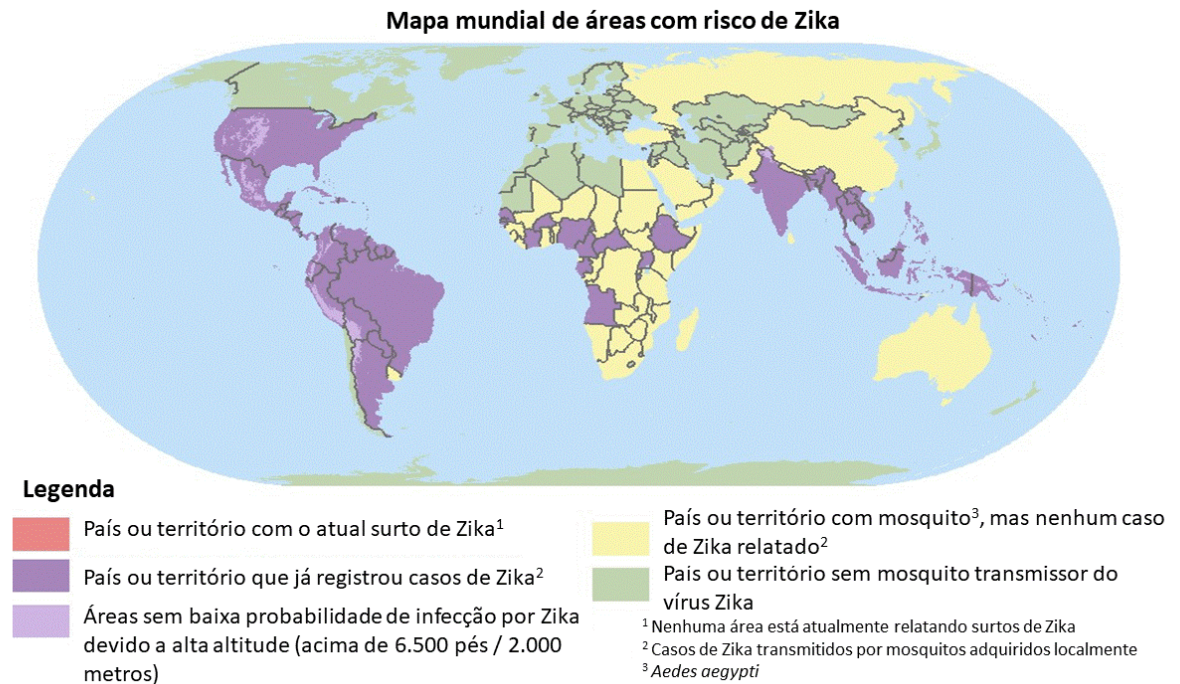


Figura 5: Distribuição dos países e territórios na área de risco de infecção por Zika vírus. Fonte: Adaptado de CDC <https://wwwnc.cdc.gov/travel/files/zika-areas-of-risk.pdf>.

Em Pedro Juan Caballero no Paraguai os casos de Zika começaram no final de 2015, com seis casos próximos da fronteira seca com Ponta Porã no Brasil, especificamente nos bairros de San Gerardo, San Antonio, Guarani e Mariscal Estigarribia (PARAGUAI, 2016). No ano de 2018 foram notificados sete casos da doença no país (PARAGUAI, 2018) e no ano de 2019 nenhum caso foi notificado até o momento. Apesar do o número de casos notificados estar diminuindo no Paraguai, a vigilância deve permanecer, principalmente pela possibilidade de efeitos associados a morbidade e mortalidade de indivíduos. O controle de mosquitos é um importante componente de prevenção e gerenciamento do vírus Zika e complicações. A OMS encoraja os países afetados e seus parceiros a intensificar o uso das atuais intervenções de controle dos mosquitos como a linha de defesa mais imediata (WHO, 2019b).

Controle Vetorial

O controle do *Aedes* tem constituído um importante desafio (ZARA et al, 2016). Apesar de nas últimas décadas existir a recomendação do controle integrado do

mosquito, que consiste na combinação de métodos de controle disponíveis, de maneira eficaz, econômica, segura, racional, envolvendo o poder público e a sociedade, com objetivo de manter as populações do vetor abaixo do limiar de transmissão (OPAS, 1994; DONALÍSIO & GLASSER, 2002), a metodologia de controle mais empregada é o controle químico com inseticidas de origem orgânica ou inorgânica (ROUSH & MCKENZIE, 1987; PRICE, 1991; BRAGA & VALLE, 2007). Durante as últimas décadas, o temefós, um inseticida da classe dos organofosforados, barato e com baixa toxicidade para mamíferos, foi utilizado para o combate de focos de larvas de *Ae. aegypti* no Paraguai (CORONEL et al, 2016). Um dos maiores problemas associados ao controle químico é a seleção da resistência nas populações de insetos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (1975), a resistência a inseticidas se define como a habilidade de uma população de insetos de tolerar doses de um inseticida que seriam letais para a maioria dos indivíduos de uma população da mesma espécie em condições normais, ou seja, sem a pressão constante de inseticidas. De modo geral, inicialmente, os alelos que conferem resistência estão em frequência muito baixa em uma população, porém o uso contínuo de inseticidas químicos, pode a cada geração selecionar indivíduos com alelos para a resistência, e alcançar níveis que comprometem o controle (ROUSH & MCKENZIE, 1987; PRICE, 1991; BRAGA & VALLE, 2007).

Atualmente o uso do temefós está sendo cada vez mais restrito em saúde pública devido a relatos de seleção de resistência em populações de mosquitos em diversos países latino americanos (MACORIS et al, 1995; BISSET et al, 2004; RODRÍGUEZ et al, 2007; ALBRIEU-LLINÁS et al, 2010).

A cidade de Pedro Juan Caballero é localizada na fronteira com o Brasil (Figura 6) na cidade de Ponta Porã (MS) (Figura 7). As duas cidades têm uma particularidade em relação à sua condição de fronteira: são consideradas cidades-gêmeas, caracterizadas pela maior proximidade de seus limites como podemos observar na Figura 7 e pelas diversas e diversificadas relações socioculturais que tal proximidade enseja (NASCIMENTO & ANDRADE, 2018).



Figura 6: Demarcação fronteira do Paraguai com Brasil, Bolívia e Argentina. Em Amarelo a cidade de Pedro Juan (Paraguai), divisa com o Brasil. Fonte: Cartografia SENEPA.



Figura 7: Fronteira Pedro Juan Caballero (Paraguai) e Ponta Porã (Brasil). Fonte: <http://www.douradosnews.com.br>.

Atualmente não há informações sobre a resistência da população de Pedro Juan Caballero aos inseticidas utilizados como controle de vetores.

Por meio de provas biológicas de susceptibilidade é possível realizar a detecção de indivíduos resistentes em uma população de insetos e buscar opções de métodos alternativos de controle ou substituição de inseticida antes que essa resistência chegue a um patamar irreversível. O *Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo* (SENEPA) é o responsável, entre outras atividades pela vigilância e controle vetorial do *Ae. aegypti*, nesse aspecto também é responsável pelo monitoramento da susceptibilidade e resistência aos inseticidas usados nos trabalhos de controle vetorial. O objetivo deste trabalho é avaliar a susceptibilidade a inseticida da população de *Ae. aegypti* da cidade de Pedro Juan Caballero, já que atualmente não existe qualquer informação sobre essa população. O resultado obtido poderá auxiliar nas ações de controle vetorial da região.

2. OBJETIVO GERAL

Fornecer dados sobre susceptibilidade a inseticidas que auxiliarão ações de controle vetorial.

3. OBJETIVO(S) ESPECÍFICO(S)

- Determinar a susceptibilidade ao inseticida temefós de larvas de mosquitos da espécie *Ae. aegypti* da cidade de Pedro Juan Caballero, Paraguai.
- Determinar a frequência de resistência fenotípica ao inseticida deltametrina de mosquitos fêmeas adultos da espécie *Ae. aegypti* da cidade de Pedro Juan Caballero, Paraguai.
- Determinar a frequência de resistência fenotípica ao inseticida malation de mosquitos fêmeas adultos da espécie *Ae. aegypti* da cidade de Pedro Juan Caballero, Paraguai

4. METODOLOGIA

Amostragem

As áreas de coleta de ovos de *Ae. aegypti* foram selecionadas por meio do software Qgis (Quantum Geographic Information System) versão 2.18.1 para computadores sistema Windows (GNU, Boston, MA, USA), de forma aleatória no 17 bairros da cidade de Pedro Juan Caballero. Foram selecionadas um total de 400 residências distribuídas em igual quantidade por quarteirão na cidade de Pedro Juan Caballero (Figura 8).

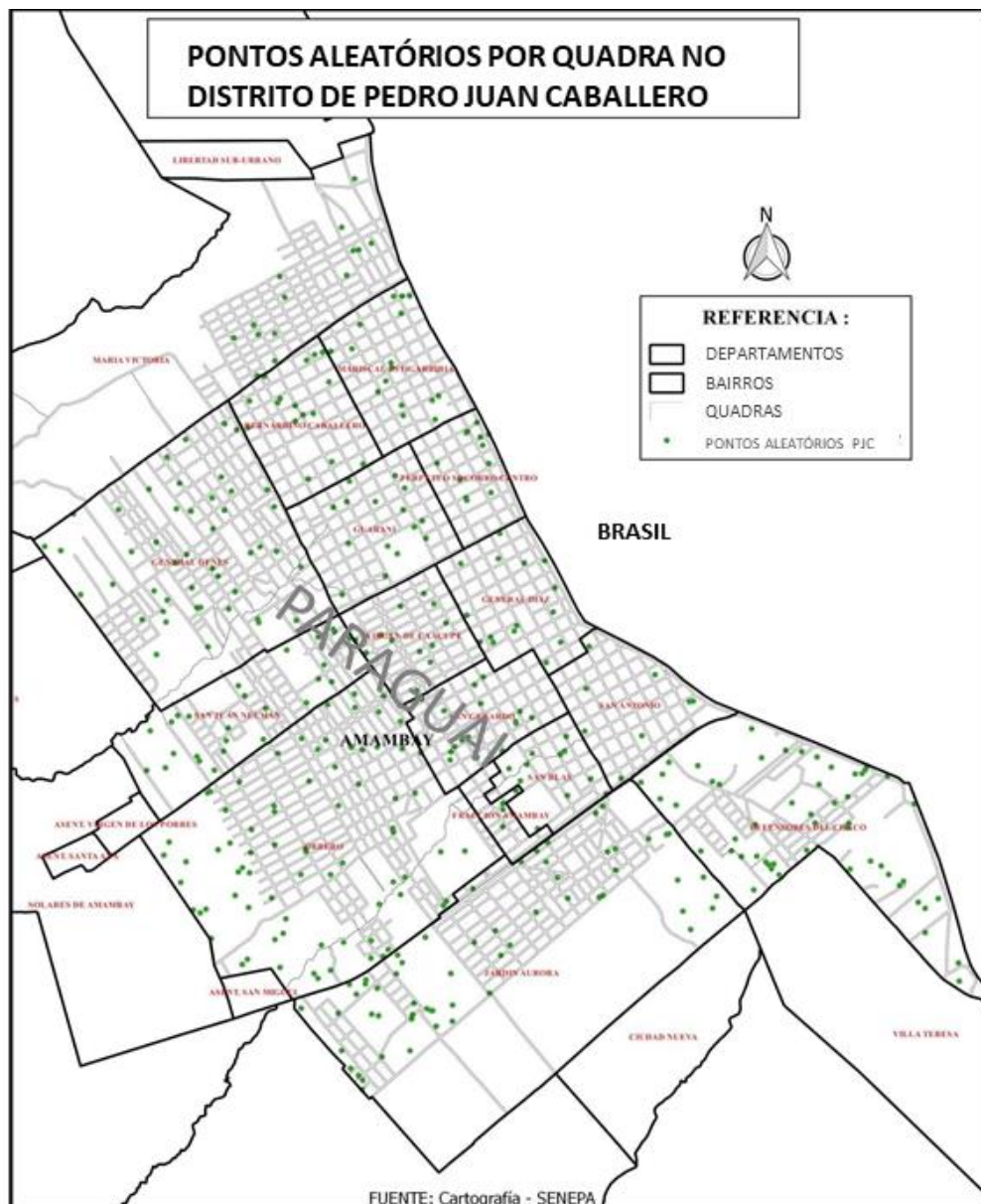


Figura 8: Distribuição de ovitrampas para coleta de ovos de *Ae. aegypti* na cidade de Pedro Juan Caballero.

Coleta de ovos

A coleta de ovos de *Ae. aegypti* foi realizada através da instalação de armadilhas de oviposição, conhecidas como ovitrampas, adaptada por Fay & Eliason (1966).

Foram instaladas 400 armadilhas distribuídas no peridomicílio de residências dos 17 bairros da cidade de Pedro Juan Caballero no período de 17 a 27 de abril de 2018. As armadilhas consistiram de um recipiente na forma de um vaso plástico preto, com capacidade de 500 mL e com orifícios laterais para escoamento d'água em caso de precipitação pluvial. Como suporte para oviposição foi colocada verticalmente no interior do vaso, uma paleta de eucatex com dimensão de 2 cm x 12,5 cm, sendo que

a face rugosa era voltada para o interior do vaso e fixadas com um clipe metálico para que fêmeas de *Ae. aegypti* pudessem realizar a oviposição. Em cada ovitrampa foi adicionado 250 a 300 mL de água da rede de abastecimento local sem o uso de atrativos. Cada paleta foi enumerada e as armadilhas foram retiradas após seis dias. As paletas foram secas em temperatura ambiente e enviadas ao Laboratório de Entomologia para contagem dos ovos em estereomicroscópio, posterior eclosão dos ovos e criação dos mosquitos.

Criação dos mosquitos de campo em laboratório

Para a obtenção de formas adultas, as paletas com ovos foram colocadas verticalmente em recipientes plásticos com água decolorada até que estas fossem completamente submersas. Os recipientes foram devidamente identificados com o nome da população e a data de eclosão. As paletas permaneceram nos recipientes por um período de 72 horas. Após esse período, foi realizada a separação das larvas em bacias contendo 500 larvas, 1 litro de água decolorada e 1 mg de ração por larva de comida para gatos marca Wiskas® sabor de salmão. A cada três dias era oferecida ração de acordo com a necessidade.

As pupas foram transferidas para copos plásticos de 50 mL com o auxílio de uma pipeta plástica tipo Pasteur de 5 mL. Os copos com as pupas foram colocados em gaiolas de plástico de 30 x 30 x 30 cm onde permaneceram até a emergência completa dos mosquitos adultos.

Todo processo de criação ocorreu em insetário com temperatura e umidade controlados ($26 \pm 2^\circ\text{C}$ / RH $70 \pm 10\%$). Para obtenção de ovos da geração F1, as fêmeas parentais dos mosquitos foram alimentadas com sangue de cobaia da espécie *Cavia porcellus* (Linnaeus, 1758) após o mínimo de três dias de vida em contato com machos para que ocorresse a cópula. Três dias após a alimentação sanguínea copo plástico preto com as paredes internas recoberta por papel filtro e contendo água decolorada foram introduzidos na gaiola, devidamente identificados com nome da população, data e geração, para a realização de postura de ovos pelas fêmeas. Esses copos permaneceram na gaiola por três dias, depois foram retirados, o excesso de água foi descartado e colocados para secar em temperatura e umidade controlada dentro de bacia plástica com tampa telada. Depois de secos, os ovos foram armazenados em envelopes de papel e mantidos em insetário.

Inseticidas

Temefós (PESTANAL[®] - 95,6% temefós i.a., Sigma - Aldrich), Deltametrina (PESTANAL[®] - 99,9% deltametrina i.a., Sigma - Aldrich) e Malation (PESTANAL[®] - 99,2% malation i.a., Sigma - Aldrich) foram utilizados nos ensaios de laboratório.

Bioensaios

Todos os bioensaios foram conduzidos com a geração F1 da população de campo.

O bioensaio com temefós foi realizado com base no protocolo da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1981). Para cada dosagem, 80 larvas L3 (quatro réplicas contendo 20 larvas cada em copos plásticos brancos contendo 100ml de solução) foram expostas a 12 doses diferentes de inseticida (entre 0,0033 e 0,054 mg /L). Os ensaios foram realizados três vezes, em dias diferentes, para a população de Pedro Juan Caballero e para a linhagem Rockefeller (referência de susceptibilidade a inseticida para *Ae. aegypti*) (Kuno, 2010). A solução de temefós foi preparada com etanol e água desclorada. Para o grupo controle, apenas etanol (0,6%) foi utilizado. A leitura da mortalidade foi realizada após 24 horas de exposição.

Os bioensaios de garrafa foram conduzidos seguindo protocolo do CDC (2010) e WHO (2016). Deltametrina pestanal e malation pestanal (Sigma Aldrich) foram escolhidos por coincidir com os ingredientes ativos usados em medidas de controle local. Alíquotas de solução estoque na concentração de 3 mg/mL foram armazenadas em freezer a -80°C e diluições com acetona padrão analítico (P.A) a 10 µg/mL para deltametrina e 50 µg/mL para malation foram preparadas imediatamente antes do uso.

Para cada ensaio foram utilizadas garrafas de vidro Wheaton[®] (250 mL), quatro tratadas com 1 mL de solução de inseticida e duas tratadas com 1mL de acetona a cada uma. A cada 15 minutos foi realizado registro de mortalidade até que todos os mosquitos estivessem mortos ou ao limite máximo de duas horas. O ensaio foi repetido por três vezes em dias diferentes.

Análises estatísticas

Índice de positividade de ovitrampas – Calculado pelo número de armadilhas positivas x 100 / número de ovitrampas recolhidas.

Bioensaio com larvas - As concentrações letais (CL's) foram calculadas usando a análise Probit, pacote de estatísticas Polo-PC (RAYMOND, 1985) e as razões de resistência (RR) foram calculadas pela divisão da CL de Pedro Juan Caballero pela

respectiva concentração letal da linhagem Rockefeller. A população foi classificada segundo os critérios de Mazzari e Georgiou (1995) em que populações com $RR < 3$ são consideradas suscetíveis, $RR > 3$ e < 5 populações com baixa resistência, populações com $RR > 5$ e < 10 moderadamente resistentes e $RR > 10$, altamente resistentes.

Bioensaios com adultos – A resistência fenotípica das populações foram caracterizadas de acordo com o critério WHO (2016) no tempo discriminatório dos inseticidas (30 minutos) para ensaio com garrafas impregnadas com inseticida:

98 – 100 % de Mortalidade: Susceptível

90 – 97 % Mortalidade: Possibilidade de resistência

< 90% Mortalidade: Resistência confirmada

Considerações éticas

A assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi solicitada aos donos das residências onde as ovitrampas foram instaladas para a coleta de ovos. Os dados como identificação do participante e endereço se manterão de modo confidencial neste estudo. (Anexo 1). A alimentação de mosquitos com sangue de cobaio foi autorizada pelo Comité de Etica en Investigación (CEI) do Laboratorio Central de Saúde Pública do Paraguai (Anexo 2).

5. RESULTADOS

No período de 17 a 27 de Abril de 2018 foram coletados ovos de *Ae. aegypti* em bairros de Pedro Juan Caballero. A tabela 1 mostra os dados da coleta.

Tabela 1: Análise descritiva da coleta de ovos de *Ae. aegypti* em Pedro Juan Caballero por meio de ovitrampas.

Bairro	Locais visitados	Locais Positivos	Ovitrampas instaladas	Paletas positivas	Paletas negativas	Paletas perdidas	Números de ovos	IPO* (%)
Solares de Amambay	8	7	16	10	6	0	228	62,50
San Antonio	8	7	16	8	8	0	110	50,00

Fracción de Amambay	3	3	6	3	3	0	223	50,00
Perpetuo Socorro	10	9	20	14	6	0	171	70,00
Bernardino Caballero	16	16	32	30	2	0	735	93,75
Mcal Estigarribia	19	19	38	35	3	0	243	92,11
San Gerardo	15	15	30	24	6	0	638	80,00
San Blás	12	12	24	19	5	0	900	79,17
María Victoria	12	10	24	14	10	0	406	58,33
Guaraní	15	15	30	23	7	0	384	76,67
General Genes	44	40	88	61	25	2	1421	69,32
Virgen de Caacupé	12	12	24	20	4	0	558	83,33
Gral Díaz	15	13	30	19	11	0	572	63,33
San Juan Neuman	26	24	52	43	9	0	1309	82,69
Aurora	63	60	126	94	31	1	2523	74,60
Obrero	75	73	150	126	22	2	3022	84,00
Defensores del Chaco	47	40	94	63	30	1	1387	67,02
Total	400	375	800	606	188	6	14830	75,75

* IPO - Índice de positividade de ovitrampas

Determinação da susceptibilidade ao temefós:

Os bioensaios realizados de acordo com a metodologia OMS foram capazes de determinar o perfil de susceptibilidade da população de *Ae. aegypti* da população de Pedro Juan Caballero, estes ensaios foram realizados ao mesmo tempo para a linhagem Rockefeller. A amplitude do efeito dose-resposta ao organofosforado temefós pode ser observada na Figura 9. É possível observar o efeito dose dependente do inseticida sobre a população de campo e a linhagem de referência, além disso, doses mais altas tiveram que ser utilizadas sobre a população de campo para obter resultados semelhantes aos da linhagem referência.

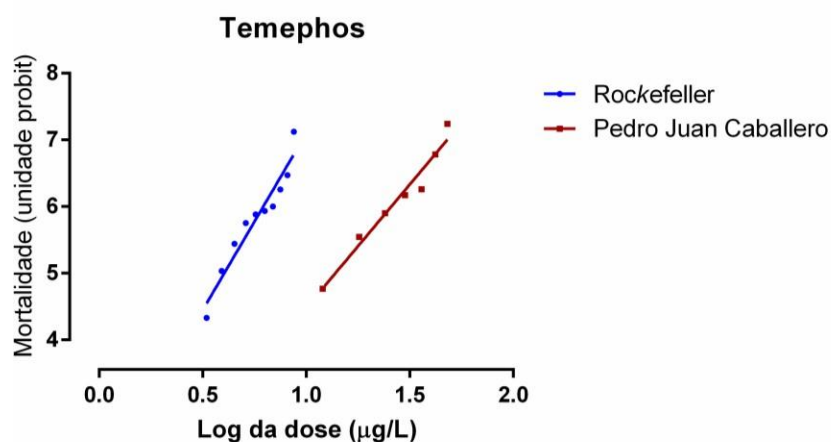


Figura 9: Amplitude do efeito dose resposta do organofosforado temefós sobre a linhagem Rockefeller e a população de Pedro Juan Caballero de *Ae. aegypti*.

Tabela 2: Resistência ao larvicida temefós em larvas de estágio L3 de *Ae. aegypti* da População Pedro Juan Caballero e da linhagem Rockefeller

População	Slope	CL50	IC	RR50	CL95	IC	RR95
Rockefeller	3,9310	0,00358	0,00329 - 0,00382	-	0,00938	0,00875 - 0,01024	-
Pedro Juan Caballero	3,5028	0,01013	0,00932 - 0,01087	2,83	0,02987	0,02767 - 0,03275	3,18

CL= concentração letal (mg/L) IC= Intervalo de confiança RR= Razão de Resistência

O cálculo da Razão de resistência para a população de Pedro Juan Caballero foi realizado da seguinte maneira: CL de Pedro Juan Caballero / CL de Rockefeller. A Razão de Resistência 95 obteve resultado de 3,18, o que segundo os critérios de Mazzarri e Georghiou (1995) caracteriza uma população com baixa resistência ao larvicida temefós.

Determinação da susceptibilidade a deltametrina:

No caso dos mosquitos de Pedro Juan Caballero a mortalidade atingida no período de 30 minutos foi de 84% como podemos observar na figura 10. Sendo assim, podemos considerar a população de *Ae. aegypti* de Pedro Juan Caballero resistente ao inseticida deltametrina.

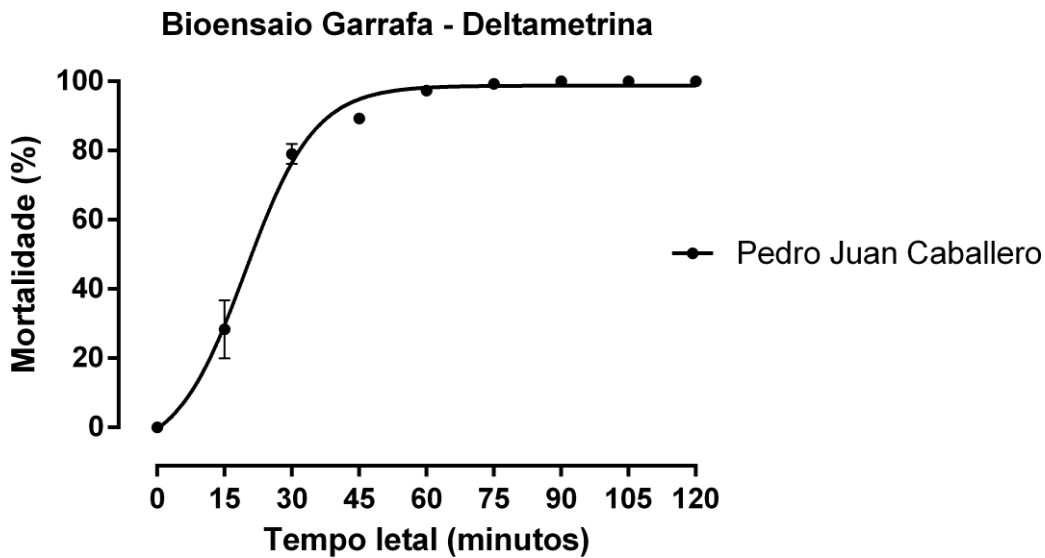


Figura 10: Mortalidade de fêmeas de *Ae. aegypti* de Pedro Juan Caballero expostas a garrafas impregnadas com o inseticida deltametrina

Mortalidade acima de 90% foi obtida somente após 60 minutos de exposição e 100% de mortalidade ocorreu somente após 75 minutos de exposição ao inseticida deltametrina.

Determinação da susceptibilidade a malation:

No ensaio de garrafa com o inseticida malation a população de Pedro Juan Caballero obteve mortalidade de 100% após 30 minutos de exposição. De acordo com o Protocolo WHO (2016) populações com mortalidade acima de 98% são consideradas susceptíveis, logo Pedro Juan Caballero se encontra na faixa sensível ao malation como podemos observar na Figura 11.

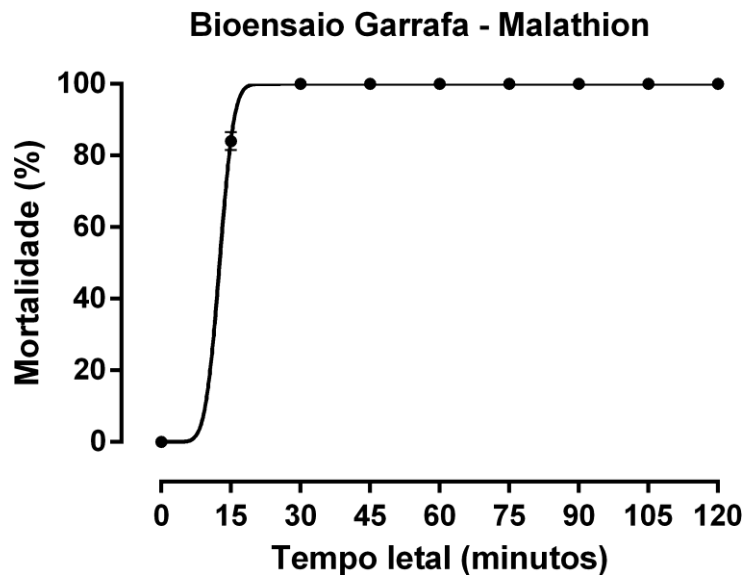


Figura 11: Mortalidade de fêmeas de *Ae. aegypti* de Pedro Juan Caballero expostas a garrafas impregnadas com o inseticida malation.

6. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi determinar a suscetibilidade a inseticidas de mosquitos *Ae. aegypti* em uma cidade na fronteira com a cidade de Ponta Porã (Brasil), onde tais avaliações não foram realizadas até o momento. As diferentes respostas ao larvicida temefós e aos adulticidas deltametrina e malation foram analisadas.

No Paraguai o larvicida temefós teve uso contínuo por quase 30 anos. Apesar disso, existem poucos dados na literatura sobre avaliação da resistência das populações locais de *Ae. aegypti* frente a esse produto (FERREIRA et al, 2015; CORONEL, 2016). O fenômeno da resistência se deve a pressão de seleção de indivíduos naturalmente resistentes de uma população (BRAGA & VALLE, 2007). Devido ao uso contínuo casos de populações de *Ae. aegypti* resistentes ao temefós vem sendo relatados em todo o mundo (CALDERON-ARGUEDAS & TROYO, 2016; GRISALIS et al, 2013; RANSON et al, 2010), inclusive no Brasil (LIMA, et al, 2003; BRAGA et al, 2004; DIAS et al, 2017; VALLE, et al, 2019). As avaliações com o larvicida temefós para a população Pedro Juan Caballero (PJC) apresentaram baixa resistência ao produto (RR95= 3,18), esse resultado corrobora com os obtidos para as populações das cidades Assunção (FERREIRA et al, 2015) e Ciudad del Este (CORONEL et al., 2016), onde também se observou RR superior a 3. Infelizmente não encontramos dados anteriores sobre a avaliação da resistência da população de Pedro Juan Caballero ou da cidade vizinha Ponta Porã.

Além da possibilidade de seleção da resistência por causa do uso contínuo de um determinado inseticida, a proximidade singular entre Pedro Juan Caballero e a cidade brasileira Ponta Porã (NASCIMENTO & ANDRADE, 2018) é um fator que pode facilitar a migração de alelos resistentes. Segundo Nazni et al. (2005) a reversão da resistência pode ocorrer após longos períodos da população livre de inseticida, mas isso pode acontecer de forma muito lenta (WIRTH & GEORGIU, 1999).

Em outros países da América Latina foram realizadas avaliações do larvicida temefós frente a larvas de *Ae. aegypti*, mas com resultados com diferentes como o relatado por Calderon-Arguedas & Troyo (2014), onde uma população na região caribenha da Costa Rica não apresentou nenhum nível de resistência ao larvicida. Outro trabalho realizado com mosquitos de Misiones e Buenos Aires na Argentina obtiveram resultados semelhantes (BISSET et al., 2014). No caso da Argentina, os autores sugeriram que a ausência de resistência poderia ser justificada por sua situação geográfica

e diferenças climáticas em comparação com os demais países da região, considerando que os surtos de arbovírus costumam ocorrer esporadicamente neste país, portanto, seria estimado exposição reduzida a temefós em populações de *Ae. aegypti*.

Quanto à susceptibilidade aos temefós, no Brasil a situação varia de acordo com cada município avaliado. No Estado do Paraná, nos municípios de Foz do Iguaçu e Jacarezinho, são reportados dados comparáveis aos deste estudo (RR 3,9; RR 3, respectivamente), diferentemente dos reportados para Maringá e Ibiporã que apresentaram resistência média (RR₉₅ > 5 e < 10) (DUQUE et al, 2015). No Estado da Paraíba, especificamente em Piabas, foi encontrada uma razão de resistência de 4, apresentando resistência baixa semelhante à encontrada no Pedro Juan Caballero. No mesmo estado, três municípios de Campina Grande, Lagoa do Mato e Capim de Cheiro apresentaram resistência moderada. Já os municípios de Boqueirão (RR: 11), Brejo dos Santos (RR: 16,6) e Itaporanga (RR 15,6) demonstrando alta resistência ao produto (BESERRA et al, 2007). Considerando as semelhanças encontradas entre os municípios do Brasil e o Pedro Juan Caballero, no Paraguai, parece haver uma associação entre a intensa exposição ao temefós e o surgimento de resistência em vários níveis. A intensa e contínua exposição ao temefós, na região, é explicada pelos recorrentes surtos de arboviroses.

Em outras regiões das Américas, como Guayaquil-Ecuador, em duas populações estudadas, foram observadas discrepâncias. Em Pascuales, a resistência foi demonstrada e em Guayacanes, a suscetibilidade foi encontrada (TERÁN et al, 2014). Em 2007, em dois bairros do município de La Dorada, foi encontrada resistência ao temefós, mas em 2011 um novo estudo mostrou uma redução no grau de resistência nesses bairros. Seria interessante analisar se essa diferença relatada entre os resultados de 2007 e 2011 está relacionada a qualquer mudança de larvicida que tenha sido feita nessas cidades (CONDE et al, 2015). Trabalhos realizados na Venezuela, nos Estados de Tachira, Zulia e Falcón publicaram valores que indicam suscetibilidade ao larvicida (RR: 1,2, 2, 2 e 1,6 respectivamente) (ÁLVAREZ et al., 2006).

Cabe ressaltar que em meados de 2018 o SENEPA instituiu a rotação do temefós pelo biolarvicida pyriproxyfen no Paraguai (SENEPA – Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo, 2018), o monitoramento da susceptibilidade de Pedro Juan Caballero ao temefós e ao pyriproxyfen pode auxiliar no uso eficaz de inseticidas e controle desses mosquitos na região

Analisando os dados referentes ao aduicida deltametrina, os resultados obtidos

para Pedro Juan Caballer indicam a existência de resistência fenotípica (mortalidade de 84% após 30 minutos de exposição). A resistência de populações de *Ae. aegypti* a diversos piretróides incluindo deltametrina tem sido descrita em várias partes do mundo (DA-CUNHA et al., 2005; MOYES et al, 2017; VAZQUEZ-PROKOPEC et al, 2017; VALLE et al, 2019;) e está relacionada à ocorrência de uma pressão de seleção nas populações do vetor por inseticidas (BROGDON & MCALLISTER, 1998; ROSE, 2001) e à existência de resistência cruzada com o DDT (BROGDON & MCALLISTER, 1998) e temefós (WIRTH & GEORGHIOU, 1999). No Paraguai o inseticida deltametrina teve uso contínuo por mais de 20 anos (SENEPA – Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo, 2010), e foi utilizado preferencialmente na pulverização espacial e focal até 2018 (SENEPA – Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo, 2018). Infelizmente não há informações sobre o nível de susceptibilidade a deltametrina da população de *Ae. aegypti* da área estudada, porém uma avaliação realizada por Garcia et al (2018) apontou resistência a deltametrina no município em Campo Grande, capital do estado brasileiro de Mato Grosso do Sul, estado que faz fronteira com o município de Pedro Juan Caballero. O inseticida deltametrina foi substituído pelo uso do malation no ano de 2018 no Paraguai e vem sendo utilizado até o momento (SENEPA – Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo, 2018). Estes resultados estão de acordo com achados da região do Caribe na Costa Rica (BISSET et al, 2014), por outro lado, diferem dos resultados em Misiones e Buenos Aires, onde as populações mostraram sensibilidade; como no Panamá, onde oito populações suscetíveis à piretróide deltametrina foram relatadas (CÁCERES et al, 2012). Tal fato parece estar relacionado ao menor número de casos de arboviroses registradas por ano, comparado a outros países da região, o que pode reduzir consideravelmente a pressão de seleção de mosquitos com o uso de inseticidas. Resultados semelhantes foram encontrados no Departamento do Atlântico - Colômbia, no qual foram estudadas populações de cinco municípios (Barranquilla, Soledad, Malambo, Puerto Colombia e Baranoa) (MAESTRE et al, 2010), em que todas se apresentaram como suscetíveis. Da mesma forma, no trabalho de Santacoloma et al (2010), das 13 populações investigadas, apenas uma apresentou resistência. Em Cuba, no município de Boyeros, os resultados determinaram populações resistentes à deltametrina (RODRÍGUEZ et al, 2009), estando de acordo com a história de casos de dengue relatados por Cuba.

Com relação ao adulticida malation, os resultados de suscetibilidade observados na população de Pedro Juan Caballero estão de acordo com sua recente introdução em

2018 no país (SENEPA – Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo, 2018), também na Colômbia com o trabalho de Maestre et al (2010) foram obtidos resultados de suscetibilidade em 5 municípios, bem como o trabalho realizado por Rodríguez et al (2009) em Santiago de Cuba, Cuba. Na Venezuela, apesar de seu uso amplo e contínuo nos programas de controle do *Ae. aegypti*, um status de suscetibilidade foi observado em seis áreas urbanas com alto índice de casos de arboviroses (MOLINA et al, 2013).

Os dados aqui relatados indicam que ainda existe suscetibilidade ao malation em *Ae. aegypti*, semelhante ao encontrado em Pedro Juan Caballero. Um dado interessante para é o relatado por Vianna-Medeiros et al (2018), que indica que, embora os mecanismos de surgimento de resistência ao malation e ao temefós sejam diferentes, parece haver um impacto negativo entre o uso de malation e resistência a temefós. O monitoramento da resistência do *Ae. aegypti* a inseticidas pode nortear as ações dos programas de controle do vetor e evitar ou reduzir as proporções de possíveis surtos de arboviroses das quais esse inseto pode ser vetor.

7. CONCLUSÕES

- A população de *Ae. aegypti* da cidade de Pedro Juan Caballero mostrou baixa resistência ao temefós.
- A frequência fenotípica de resistência ao inseticida deltametrina em mosquitos adultos da população investigada aponta para resistência a esse inseticida.
- A frequência fenotípica de resistência ao inseticida malation em mosquitos adultos da população investigada aponta para suscetibilidade a esse inseticida.

Os resultados obtidos neste trabalho serão fundamentais para a tomada de decisão quanto ao uso de inseticidas no programa de controle vetorial na cidade de Pedro Juan Caballero.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRIEU-LLINÁS, G.A.; SECCACINI, E.; GARDENAL, C.N.; LICASTRO, S. Current resistance status to temephos in *Aedes aegypti* from different regions of Argentina. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 105, n. 1, p.113-6, Feb. 2010.

ÁLVAREZ, L.; BRICEÑI, A.; OVIEDO, M. Resistencia al Temephos en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del occidente de Venezuela. **Rev. Colomb. Entomol.**, Bogotá. v. 32, n. 2, p. 172-175, Dec. 2006.

BARNETT E.D. Yellow fever: epidemiology and prevention. **Clin. Infect. Dis.**, Oxford. v. 44, n. 6, 850–6, Mar. 2007.

BESERRA, E.B.; FERNANDES, C.R.; DE QUEIROGA, M.; DE CASTRO, F.P. Resistência de Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao Organofosforado Temefós na Paraíba. **Neotrop. Entomol.** Londrina. V. 36, n. 2, p. 303-307, Apr. 2017.

BISSET, J.A.; RODRÍGUEZ, M.M.; FERNÁNDEZ, D.; PÉREZ, O. Status of resistance to insecticides and resistance mechanisms in larvae from Playa municipality collected during the intensive campaign against *Aedes aegypti* in Havana City, 2001– 2002. **Rev. Cubana Med Trop.**, Havana. v. 56, n. 1, p. 61-6, Jan.-Apr. 2004.

BISSET, J.A.; MONDELO, R.E.; RODRIGUEZ, M.R.; LEYVA, Y.R.; HURTADO, D.; FUENTES, I. Evaluación de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Argentina. **Rev. Cubana de Med. Trop.**, Havana. v. 66, n. 3, p. 360- 369, Dec. 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica/ Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância epidemiológica. 7th ed., Brasília: Ministério da Saúde. 2009.

BRAGA, I.A.; LIMA, J.B.P.; SOARES, S.S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 99, n. 2, p. 199- 203, Mar. 2004.

BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília. v. 16, n. 4, p. 179–293, Dec. 2007.

BRITO, C.A.A. Alert: Severe cases and deaths associated with Chikungunya in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba , v. 50, n. 5, p. 585-589, Sept. 2017.

BROGDON, W.G.; MCALLISTER, J.C. Insecticide resistance and vector control. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta. v. 4, n. 4, p. 605-13. Oct-Dec. 1998.

BUENO, F.T.C.; GARCÍA, M.; MOYA, J.; LÖWY, I.; BENCHIMOL, J.L.; CERQUEIRA, R.C.; CUETO, M. Zika e *Aedes aegypti*: antigos e novos desafios. **Hist. cienc. saude-Manguinhos**, Rio de Janeiro , v. 24, n. 4, p. 1161-1180, Oct. 2017.

CÁCERES, L.; ROVIRA, J.; GARCÍA, A.; TORRES, R.; DE LA CRUZ, M. Determinación de la sensibilidad a insecticidas organofosforados, carbamato y piretorides en poblaciones de *Aedes aegypti* Linneaus, 1762 (Diptera: Culicidae) de Panamá. **Biomédica**,

Bogotá. v. 33, supl. 1, p. 70-81, Sept. 2013.

CALDEIRA, J.C. **Avaliação de membranas para alimentação artificial de colônias de culicídeos mantidas em laboratório**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas). Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro.

CALDERON-ARGUEDAS, O.; TROYO, C.A. Perfil de resistencia a insecticidas en una cepa de *Aedes aegypti* (Linnaeus) de la región Caribe de Costa Rica. **Rev. Cubana de Med. Trop.**, Havana. v. 66, n. 3, p. 351-359, Dec. 2014.

CALDERON-ARGUEDAS, O.; TROYO C.A. Evaluación de la resistencia a insecticidas en cepas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de la Región Caribe de Costa Rica. **Rev. Cubana de Med. Trop.**, Havana. v. 68, n. 1, p. 95-104, Apr. 2016.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. About dengue: What You Need to Know. 2019a. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dengue/about/index.html>>. Acesso em: 26 jun. 2019.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Transmission of Yellow Fever Virus. 2019b. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/yellowfever/transmission/index.html>>. Acesso em: 26 jun. 2019.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Chikungunya Virus Symptoms, Diagnosis, & Treatment. 2019c. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/chikungunya/symptoms/index.html>>. Acesso em: 26 jun. 2019.

CONDE, M.; ORIJUELA, L.I.; CASTELLANOS, C.A.; HERRERA, M. LICASTRO, S. QUIÑONES, M.L. Evaluación de la sensibilidad a insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del departamento de Caldas, Colombia, en 2007 y 2011. **Biomédica**, Bogotá. v. 35, n.1, p. 43-52, Mar. 2015.

CONSOLI, R., LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 1 ed. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1994.

CORONEL, M.F.; DIAS, L.S.; RODOVALHO, C.M.; LIMA, J.B.P.; BRITEZ, N.G. Perfil de susceptibilidad a Temefos en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Ciudad del Este - Alto Paraná, Paraguay. **Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.**, San Lorenzo. v. 14, n. 2, p. 98-105, Aug. 2016.

DA-CUNHA, M.P.; LIMA, J.B.P.; BROGDON, W.G.; MOYA, G.E. & VALLE, D. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 100, n. 4, p. 441-4. Jul. 2005.

DIAS, L.S.; MACORIS, M.L.; ANDRIGHETTI, M.T.; OTRERA, V.C.; DIAS, A.S.; BAUZER, L.G.; RODOVALHO, C.M.; MARTINS, A.J.; LIMA, J.B. Toxicity of spinosad to temephos-resistant *Aedes aegypti* populations in Brazil. **PLoS One**, San Francisco. v. 12, n. 3, e0173689 eCollection. Mar 2017.

DONALÍSIO, M.R. & GLASSER, C.M. Vigilância entomológica e controle de vetores do

dengue. **Rev. Bras. Epidemiol.** São Paulo. v. 5, n. 3, p. 259–279. Dec. 2002 5(3), pp..

DUQUE, J.E.; SILVA, A.M.; FANTINATTI, E.C.; NAVARRO, M.A. Resistance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to temefos in Paraná State, Brazil. **Rev. Colomb. Entomol.** Bogotá. v. 41, n. 2, p. 205-211. Dec. 2015.

FERREIRA, M.; RODOVALHO, C.; DIAS, L.; LIMA, J.B.; VALLE, D.; GONZALEZ-BRITEZ, N. Estudio de Susceptibilidad a Temefos en una cepa de *Aedes aegypti* originaria de Asunción, Paraguay. In: **XXIII Congreso Latinoamericano de Parasitología (FLAP)**, Salvador Bahía, Brasil. *Anais...* Salvador, 2015 p.546.

FORATTINI, O. P. Culicidologia médica. 1 ed., São Paulo: Edusp, 2002.

FUNASA, Fundação Nacional de Saúde. Dengue: instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas. 3rd ed., Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

GARCIA, G.A.; DAVID, M.R.; MARTINS, A.J.; MACIEL-DE-FREITAS, R.; LINSS, J.G.B.; ARAÚJO, S.C.; LIMA, J.B.P.; VALLE, D. The impact of insecticide applications on the dynamics of resistance: The case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian regions. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco. v. 12, n. 2, e00062272018 eCollection. Feb. 2018.

GUBLER, D.J. Dengue and Dengue hemorrhagic fever: its history and surge as a global public health problem. In: GUBLER, D.J.; KUNO, G. (Eds.). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. London: CAB International. 1997. p.1-22.

GRISALIS, N.; POUPARDIN, R.; GOMEZ, S.; FONSECA-GONZALEZ, I.; RANSON, H.; LENHART, A. Temefos resistance in *Aedes aegypti* in Colombia compromises dengue vector control. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco. v. 7, n. 9, e2438. Sep. 2013.

JANSEN, C.C.; BEEBE, N.W. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. **Microbes Infect.**, Paris. v. 12, n. 4, p. 272-279. Apr. 2010.

KUNO, G. Early History of Laboratory Breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Focusing on the Origins and Use of Selected Strains, **J. Med. Entomol.**, England. v. 47, n. 6, p. 957–971. Nov. 2010.

LIMA, J.B.; DA-CUNHA, M.P.; DA SILVA, R.C.; GALARDO, A.K.; SOARES, S.S.; BRAGA, I.A.; RAMOS, R.P.; VALLE, D. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** Baltimore. v. 68, n. 3, p. 329-33. Mar. 2003.

MAESTRE, R.; REY, G.; DE LAS SALAS, J.; VERGARA, C.; SANTACALOMA, L.; GOENAGA, S.; CARRAQUILLA, M.C. Estado de la susceptibilidad de *Aedes aegypti* a insecticidas en Atlántico (Colombia). **Rev. Colomb. Entomol.** Bogotá. v. 36, n. 2, p. 242-248. Dec. 2010.

MACORIS, M.L.G.; CAMARGO, M.F.; SILVA, I.G.; TAKAKU, L.; ANDRIGHETTI M.T. Modificacao a susceptibilidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* ao Temefos. **Rev. Patol. Trop.** Goiás. v. 19, p. 31-40. 1995.

MAZZARRI, M.B.; GEORGHIOU, G.P. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. **J Am Mosq Control Assoc.** New Jersey. v. 11, n. 3, p. 315- 22. Sep. 1995.

MOLINA, D.; BASTIDAS, D.M.; FIGUEROA, L.E. Malation vs. *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) de diferentes regiones de Venezuela. **Bol. Mal. Salud Amb.** Maracay, v. 53, n. 1, p. 46-55. Jan. 2013.

MOYES, C.L.; VONTAS, J.; MARTINS, A.J.; NG, L.C.; KOOU, S.Y.; DUSFOUR, I.; RAGHAVENDRA, K.; PINTO, J.; CORBEL, V.; DAVID, J.P.; WEETMAN, D.

Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLoS Negl Trop Dis.** San Francisco. v. 11, n. 7, e0005625 eCollection. Jul. 2017.

MUSTAFA, M. S.; RASOTGI, V.; JAIN, S; GUPTA, V. Discovery of fifth serotype of dengue vírus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Med. J. Armed Forces India,** New Delhi. v. 7, n. 1, p. 67-70. Nov. 2015.

NASCIMENTO, V.A.; ANDRADE, S.M.O. As armas dos fracos: estratégias, táticas e repercussões identitárias na dinâmica do acesso à saúde na fronteira Brasil/Paraguai. **Horiz. antropol.,** Porto Alegre. v. 24, n. 50, p. 181-214, Apr. 2018.

NAZNI, W.A.; LEE, H.L.; AZAHARI, A.H. Adult and larval insecticide susceptibility status of *Culex quinquefasciatus* (Say) mosquitoes in Kuala Lumpur Malaysia. **Trop. Biomed.,** Kuala Lumpur. v. 22, n. 1, p. 63–8. 2005.

OPAS, Organización Panamericana de la Salud. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Américas: guidelines for prevention and Control, 1 ed., Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud, 1994.

OPAS, Organización Panamericana de la Salud. Brote de fiebre amarilla en Paraguay. 2008. Disponível em: <[https://www.paho.org/bulletins/index.php?option=com_content&view=article&id=168: brote-fiebre-amarilla-en-paraguay&Itemid=0&lang=es](https://www.paho.org/bulletins/index.php?option=com_content&view=article&id=168:brote-fiebre-amarilla-en-paraguay&Itemid=0&lang=es)> Acesso em: 26/06/2019.

PARAGUAI, Ministerio de Saúde Pública e Bem-Estar Social. Boletim Epidemiológico Alerta Dengue, Assunção, nº 6. Fev. 2007. Disponível em: <https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/A9DE8873FEFCE41EC125729100393CBB-Reporte_completo.pdf> Acesso em: 07 Jul. 2019.

PARAGUAI, Ministerio de Saúde Pública e Bem-Estar Social. Boletim Epidemiológico Alerta Dengue, Assunção, nº 49. Dezembro. 2013. Disponível em: <www.vigisalud.gov.py>. Acesso em: 07 Jul. 2019.

PARAGUAI, Ministerio de Saúde Pública e Bem-Estar Social. Boletim Epidemiológico Alerta Dengue, Assunção, nº 52. Dezembro. 2016. Disponível em: < www.vigisalud.gov.py>. Acesso em: 07 Jul. 2019.

PARAGUAI, Ministerio de Saúde Pública e Bem-Estar Social. Boletim Epidemiológico Alerta Dengue, Assunção, nº 52. Dezembro. 2018. Disponível em: < www.vigisalud.gov.py>. Acesso em: 07 Jul. 2019.

em: 07 Jul. 2019.

PARAGUAI, Ministerio de Saúde Pública e Bem-Estar Social. Boletim Epidemiológico Alerta Dengue, Assunção, nº 22. Junho. 2019. Disponível em: < www.vigisalud.gov.py>. Acesso em: 07 Jul. 2019.

PETERSEN, L.R.; JAMIESON, D.J.; POWERS, A.M.; HONEIN, M.A. Zika virus. **N. Engl J Med.**, Boston. v. 374, n. 16, p. 1552–63. 2016.

PONLAWAT, A.; HARRINGTON, L.C. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. **J. Med. Entomol.** Oxford. v. 42, n. 5, p. 844-849. 2005.

POWELL, J.R. & TABACHNICK, W.J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 108, supl. 1, p. 11-17, 2013.

PRICE, N.R. Insect resistance to insecticides: mechanisms and diagnosis. Comparative biochemistry and physiology. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 100, n. 3, p. 319– 26.1991.

RANSON, H.; BURHANI, J.; LUMJUAN, N.; BLACK, IV W.C. Insecticide resistance in dengue vectors. **TropIKA.net.** v. 1, n 1, p. 1-12. 2010.

RAYMOND, M. Presentation d'une programme d'analyse logprobit pour microordinateur cahiers Orstrom. **Sér. Ent. Med. Parasitol.** v. 23, n. 2, p. 117-21. 1985

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4th ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008

RODRÍGUEZ, M.M.; BISSET, J.A.; FERNÁNDEZ, D. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American countries. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, Fresno. v. 23, n. 4, p. 420-9. 2007.

RODRÍGUEZ, M.M.; BISSET, J.A.; PÉREZ, O.; MONTADA, D.; MOYA, M.; RICARDO, Y.; VÁLDEZ, V. Estado de la resistencia a insecticidas y sus mecanismos en *Aedes aegypti* en el municipio Boyeros. **Rev. Cubana Med. Trop.**, Havana. v. 61, n. 2, Aug. 2009. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602009000200010&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 07 jul. 2019.

ROSE, R.I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. **Emerg. Infect. Dis.** Whashington D.C. v. 7, n. 1, p. 17-23. 2001.

ROUSH, R.T. & MCKENZIE, J.A. Ecological Genetics of Insecticide and Acaricide Resistance. **Annu. Rev. Entomol.**, Palo Alto. v. 32, n. 1, p. 361–380. 1987

SANTACOLOMA, L.; CHAVES, B.; BROCHERO, H.L. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a DDT, deltametrina y lambdacialotrina en Colombia. **Rev. Panam. Salud Publica.** Washington D.C. v. 27, n. 1, p. 66–73. 2010.

SENEPA, Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo. Directriz Técnica N° 05/2010: Vigencia de instrucciones para dilución del insecticida Deltametrina 2% emulsion acuosa (EW) para aplicaciones espaciales. Assunção: Ministério da Saúde, 2010.

SENEPA, Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo. Directriz Técnica N° 03/2018: Lineamientos sobre el uso del insecticida Malathión – Emulsión acuosa EA44 para el control del *Aedes aegypti*. Assunção: Ministério da Saúde, 2018.

SENEPA, Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo. Directriz Técnica N° 06/2018: Uso del pyriproxyfen como larvicida para formas inmaduras de *Aedes aegypti*. Assunção: Ministério da Saúde, 2018.

SVS, Secretaria de Vigilância em Saúde Brasil. Manual de Vigilância Epidemiológica da Febre Amarela. 1st ed., Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. 2004.

TAUIL, P.L. Urbanization and dengue ecology. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro. v. 17, Suppl, p.99–102. 2001.

TAUIL, P.L. Aspectos críticos do controle da febre amarela no Brasil. **Rev. Saúde Pública, São Paulo**. v. 44, n. 3, p. 555–558. 2010.

TEIXEIRA, M.G., BARRETO, M.L. & GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do Dengue. **Inf. Epidemiol. Sus**, Brasília, v. 8, n. 4, p. 5-33. Dez. 1999.

TERÁN, M.C.; RODRIGUEZ, M.M.; LEYVA, Y.R.; BISSET, J.A. Evaluación de temefos y pyriproxifeno en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Guayaquil, Ecuador. **Rev. Cubana Med. Trop.**, Havana. v. 66, n. 1, p. 71-83. 2014.

VALLE, D; BELLINATO, D. F.; VIANA-MEDEIROS, P. F.; LIMA, J. B. P.; & MARTINS JUNIOR, A.J. Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 114, e180544, 2019.

VASCONCELOS, P.F. da C. Febre amarela. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba. v. 36, n. 2, p. 275-293, Apr. 2003 .

VAZQUEZ-PROKOPEC, G.M.; MEDINA-BARREIRO, A.; CHE-MENDOZA, A.; DZUL-MANZANILLA, F.; et al. Deltamethrin resistance in *Aedes aegypti* results in treatment failure in Merida, Mexico. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 11, n. 6, e0005656 eCollection. Jun. 2017.

VIANA-MEDEIROS, P.F.; BELLINATO, D.F.; VALLE, D. Laboratory selection of *Aedes aegypti* field populations with the organophosphate malathion: Negative impacts on resistance to deltamethrin and to the organophosphate temephos. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 12, n. 8, e0006734 eCollection. Aug. 2018.

WEAVER, S.C; LECUIT, M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito- borne disease. **N Engl J Med.**, Boston. v. 372, n. 13, p. 1231–9. Mar. 2015.

WIRTH, M.C. & GEORGHIOU, G.P. Selection and characterization of temephos in a population

Aedes aegypti from Tortola, British Virgin Island. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, Fresno. v. 15, n. 3, p. 315-320. Sep. 1999.

WHO, World Health Organization. Manual on Practical Entomology in Malaria. Part II. Methods and Techniques. Geneva: WHO. 1975.

WHO, World Health Organization. Criteria and meaning of tests for determining the susceptibility or resistance of insects to insecticides. Geneva: World Health Organization. 1981.

WHO, World Health Organization. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO Press. 2009.

WHO, World Health Organization, Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vector Mosquitoes. 2nd ed. Geneva, Switzerland: WHO. 2016.

WHO, World Health Organization. Chikungunya. 2019a. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>>. Acesso em: 24 Jun. 2019.

Who, World Health Organization. Zika Virus. 2019b. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>>. Acesso em: 24 Jun. 2019.

PAHO, Pan American Health Organization. Perguntas e respostas sobre o vírus zika e suas consequências. 2019. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5292:perguntas-e-respostas-sobre-o-virus-zika-e-suas-consequencias&Itemid=882>. Acesso em: 24 Jun. 2019.

ZARA, A.L.S.A.; SANTOS, S.M.; FERNANDES-OLIVEIRA, E.S.; CARVALHO, R.G.; COELHO, G.E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 391-404, Jun. 2016.

9. ANEXOS

Anexo 1: Termo de consentimiento libre e esclarecido para a coleta de ovos nos bairros de Pedro Juan Caballero

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Tras haber recibido información verbal clara y sencilla y leer este escrito explicativo sobre el estudio: "Determinación de la susceptibilidad a insecticidas de una población de *Aedes aegypti* de la ciudad de Pedro Juan Caballero, Paraguay", he podido hacer preguntas y aclarar mis dudas sobre qué es, cómo se hace, para qué sirve y qué riesgos conlleva. Así, al entender el presente documento, doy libremente mi consentimiento para la colocación de las ovitrampas en mi vivienda.

Lugar y Fecha: Aurora 19-04-18

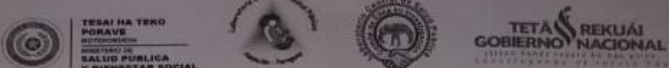
Nombre y Apellido: Leonora Gil

Firma del participante
C.I.: 3.229.344

x

6

Anexo 2: Aprobación del Comité de Ética para o Uso de Animais – CEI Laboratorio central de Salud Publica.


LABORATORIO CENTRAL DE SALUD PUBLICA
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
FWA N° FWA00020088

DICTAMEN CEI-LCSP N° 87 / 04 de mayo de 2018

CEI – LCSP

Comisión Directiva
Dra. Miryam Morán, Presidenta
Dra. Marta Centurión, Vice Presidenta
Lic. Azucena Melgarejo, Secretaria
Lic. Felicitá Duré, Secretaria Adjunta

Miembros Titulares
Dra. Magdalena Alonso
Dra. María Liz Bobadilla
Dra. María Elena Zorrilla
Dr. Andrés Canese
Dr. Rodolfo Paiva
Sra. Nuri Mar Gayoso
Dra. Ofelia Cuevas
Lic. Christian González

Suplentes
Dra. Gladys Olmedo
Dra. Odalis García
Sra. Graciela Monges

Asesora Jurídica
Abog. Karen Portillo Tullio

El Comité de Ética en Investigación (CEI), ha evaluado el Protocolo “Determinación de la susceptibilidad a insecticidas de una población de *Aedes aegypti* de la ciudad de Pedro Juan Caballero, Paraguay” Código CEI-LCSP N° 126/190418.

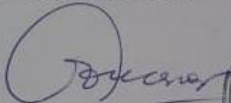
Teniendo en cuenta que el mismo reúne las consideraciones éticas.

POR TANTO:


El Comité de Ética de Investigación con Certificación Internacional FWA N° FWA00020088

RESUELVE

APROBAR el Protocolo “Determinación de la susceptibilidad a insecticidas de una población de *Aedes aegypti* de la ciudad de Pedro Juan Caballero, Paraguay”. Código CEI-LCSP N° 126/190418.


Lic. Azucena Melgarejo Samabria
Secretaria


Dra. Marta Centurión Noguera
Vice Presidenta



Dirección: Av. Venezuela y Tte. Francisco Escurra – Asunción, Paraguay
Tele-fax: 595-21-292.653 / 595-21-281.630 / 595-21-294.999
Email: biblioteca@lcsp.gov.py