

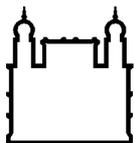
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E PERFIL DE RESISTÊNCIA DO *Aedes albopictus*
(SKUSE, 1894) NA ILHA DE PAQUETÁ, RIO DE JANEIRO – BRASIL.**

THAÍS NUNES DOS SANTOS

Rio de Janeiro
Janeiro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Thaís Nunes dos Santos

Distribuição Espacial e Perfil de Resistência do *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro – Brasil.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical

Orientador: Dr. José Bento Pereira Lima

RIO DE JANEIRO

Janeiro de 2017

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S237 Santos, Thaís Nunes dos

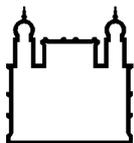
Distribuição espacial e perfil de resistência do *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro - Brasil / Thaís Nunes dos Santos. – Rio de Janeiro, 2017.
xvii, 65 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

Bibliografia: f. 53-61

1. *Aedes albopictus*. 2. Resistência. 3. Distribuição espacial.
4. Piretroide. 5. Organofosforado. I. Título.

CDD 595.772



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: THAÍS NUNES DOS SANTOS

**DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E PERFIL DE RESISTÊNCIA DO *Aedes albopictus*
(SKUSE, 1894) NA ILHA DE PAQUETÁ, RIO DE JANEIRO – BRASIL.**

ORIENTADOR: Dr. José Bento Pereira Lima

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a. Maria Goreti Rosa Freitas - **Presidente** (IOC-Fiocruz)

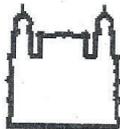
Prof. Dr. Jeronimo Augusto Fonseca Alencar (IOC-Fiocruz)

Prof. Dr. Cicero Brasileiro de Mello Neto (UFF/RJ)

Prof. Dr. Rafael Maciel de Freitas (IOC-Fiocruz)

Prof. Dr. Leonardo Soares Bastos (PROCC-Fiocruz)

Rio de Janeiro, 31 de Janeiro de 2017

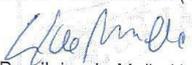


Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Medicina Tropical de **Thais Nunes dos Santos**, sob orientação do Dr. José Bento Pereira Lima. Ao trigésimo primeiro dia do mês de janeiro de dois mil e dezessete, realizou-se às treze horas, na Sala 5 - Pavilhão Arthur Neiva, o exame da dissertação de mestrado intitulada: "**Distribuição espacial e perfil de resistência do *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro-Brasil**" no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Epidemiologia e Controle de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Maria Goreti Rosa Freitas - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Cícero Brasileiro de Mello Neto - UFF/RJ, Dr. Jeronimo Augusto Fonseca Alencar - IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr. Rafael Maciel de Freitas - IOC/FIOCRUZ e Dr. Leonardo Soares Bastos - PROCC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr^a. Martha Cecilia Suárez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 31 de janeiro de 2017.


Dr^a. Maria Goreti Rosa Freitas (Presidente da Banca):


Dr. Cícero Brasileiro de Mello Neto (Membro da Banca):


Dr. Jeronimo Augusto Fonseca Alencar (Membro da Banca):


Dr^a. Martha Cecilia Suárez Mutis (Coordenador do Programa):

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360
Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: atendimento@ioc.fiocruz.br Site: www.fiocruz.br/iocensino

Aos meus pais Jonas Tiago dos Santos e Marta Nunes dos Santos, meu irmão Thiago Nunes dos Santos e meu noivo Yuri Machado Santos pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me abençoado com a chance de fazer o mestrado e por ter me dado forças para chegar até aqui.

Aos meus pais Jonas e Marta, meus grandes incentivadores. A eles e ao meu irmão Thiago por todo apoio.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical pelos dois preciosos anos de aprendizado e, em especial, à Dr^a Martha Cecilia Suárez Mutis por ter me ajudado a permanecer no mestrado frente à alguns problemas de saúde nesse período.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro.

À minha querida turma de mestrado “medtrop2015” por todo companheirismo e amizade. E à turma de 2016, também, pela parceria em algumas disciplinas.

Ao meu noivo Yuri por entender meus domingos de trabalho, por ter me apoiado, me ajudado e me dado tantas caronas de última hora. Agradeço por essa prova de amor e por ter me mostrado, mais uma vez, o quanto posso contar com ele.

Aos meus sogros Antônio e Regina pelo apoio tanto em palavras quanto em atitudes.

Ao meu orientador, Dr. José Bento Pereira Lima, por ter me recebido no Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (LAFICAVE), por ter sido atencioso, mesmo com tantas outras responsabilidades, e por ter me ensinado tanto!

À Prefeitura do Rio de Janeiro e aos agentes de vigilância em saúde da Área de Planejamento 1 pela parceria que possibilitou minhas coletas de ovos de *Aedes* spp. realizadas em Paquetá.

Ao Instituto de Biologia do Exército (IBEX) pelo suporte oferecido.

À Paula por ter dividido comigo o espaço do insetário 2, pelas ajudas quando o tempo estava curto e também pela amizade.

À Luciana pela generosidade ao compartilhar de sua experiência em bioensaios, pela paciência com meus questionamentos e por toda a atenção que me foi dada.

Ao Dr. Ademir de Jesus Martins Júnior por ter direcionado a parte molecular do meu trabalho. Também ao Luiz e à Luana Carrara pelo apoio tão importante.

À todos os colegas de trabalho no LAFICAVE: Raquel, Priscila, Kiko, Cynara, Gilberto, Sandro, Michelle, Bárbara, Daniel, Yasmim, Quesia e todos os outros. Agradeço pelo companheirismo, apoio e por terem proporcionado um ambiente de trabalho tão agradável.

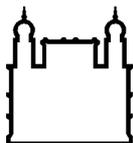
À revisora do meu trabalho, Dr^a Maria Goreti Rosa Freitas, pelas correções e apoio. À ela e aos outros membros da banca, Dr. Jeronimo Augusto Fonseca Alencar, Dr. Cicero Brasileiro de Mello Neto e os suplentes Dr. Rafael Maciel de Freitas e Dr. Leonardo Soares Bastos, por terem aceitado meu convite e pela participação.

Aos amigos e familiares que torceram por mim e deram importância ao meu trabalho e meus estudos nesses dois anos.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse até aqui, minha sincera gratidão.

“Ainda que eu... conheça todos os mistérios e toda a ciência... se não tiver amor, nada serei” I CO 13:2

“A experiência nunca falha, apenas nossas opiniões falham, ao esperar da experiência aquilo que ela não é capaz de oferecer” Leonardo da Vinci



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

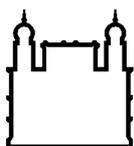
DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E PERFIL DE RESISTÊNCIA DO *Aedes albopictus* (SKUSE, 1894) NA ILHA DE PAQUETÁ, RIO DE JANEIRO – BRASIL.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Thaís Nunes dos Santos

Aedes albopictus (Skuse 1894) tem se destacado como um dos principais vetores de arbovírus ao redor do mundo. Está presente no Rio de Janeiro e tem potencial para colaborar na transmissão dos vírus dengue, chikungunya e Zika, que causam doenças para as quais não há vacina eficaz nem tratamento específico. Por habitar parte dos ambientes de *Aedes aegypti*, sofre pressão de inseticidas de uso doméstico e dos utilizados nas ações de vigilância e controle deste vetor. O objetivo deste trabalho foi avaliar a distribuição espacial e o perfil de resistência do *Ae. albopictus* na Ilha de Paquetá, RJ, Brasil. As coletas foram feitas bimestralmente, com ovitrampas por 1 ano. A cada coleta os ovos foram levados ao LAFICAVE e, separados por número de ovitrampa, contados, eclodidos, as larvas criadas até o estágio adulto, sendo então sexados e identificados. Das amostras de Janeiro e agosto, 45 espécimes foram congeladas para ensaios moleculares (PCR quantitativo – em tempo real) para detecção da mutação F1534C no gene do canal de sódio regulado por voltagem, e também foi obtida a geração F1 para bioensaios com inseticidas. Foram utilizados os inseticidas temephos (para ensaios com larvas), deltametrina e malathion (para ensaios com adultos) e calculadas as concentrações letais 50 e 95 e as razões de resistência. Foram coletados 128.587 ovos de *Aedes* spp., no período do estudo. Obtivemos o maior número de ovos em novembro de 2015 (38.705), IDO de 248 ovos e IMO de 215. Em julho de 2015 foi obtido o menor número de ovos (10.411), com IDO e IMO de 85,3 e 57,8, respectivamente. O IPO se manteve semelhante durante todo o ano, com valor máximo de 86,7% e valor mínimo de 63,9%. Foram obtidos 13.237 espécimes de *Ae. albopictus*, com maiores frequências nos meses de novembro de 2015 e janeiro e março de 2016. *Ae. albopictus* apresentou susceptibilidade nos bioensaios realizados, tanto no período de alta quanto de baixa densidade do vetor, à temephos ($RR_{95} = 1,2$ e $1,7$), deltametrina ($RR_{95} = 3,0$ e $2,3$) e malathion ($RR_{95} = 1,2$ e $1,4$). Não foram detectados alelos mutantes, apenas alelos selvagens 1534 Phe⁺. Os resultados aqui apresentados sugerem que *Ae. albopictus* ocorre com maior frequência no verão e que é encontrado, não só nas áreas com maior cobertura vegetal, mas também no ambiente urbanizado. Embora ainda suscetível aos inseticidas avaliados, mostrou maior tolerância que a linhagem referência, sugerindo que pode estar sofrendo pressão com estes produtos. Portanto, é importante que se monitore a resistência deste potencial vetor em outras localidades.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

SPACE DISTRIBUTION AND RESISTANCE PROFILE OF *Aedes albopictus* (SKUSE, 1894) ON THE ILHA DE PAQUETÁ, RIO DEJANEIRO - BRASIL

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Thaís Nunes dos Santos

Aedes albopictus (Skuse 1894) has been prominent as one of the main vectors of arboviruses around the world. It is present in Rio de Janeiro and has the potential to collaborate in the transmission of dengue, chikungunya and Zika viruses, which cause diseases for which there is no effective vaccine or specific treatment. Because it inhabits part of the environments of *Aedes aegypti*, it is under pressure from domestic insecticides and those used in the surveillance and control actions of this vector. The objective of this work was to evaluate the spatial distribution and the resistance profile of *Ae. albopictus* on the Island of Paquetá, RJ, Brazil. The collections were made bimonthly, with ovitraps for 1 year. At each collection the eggs were taken to the LAFICAVE and, separated by number of ovitrapa, counted, hatching, the larvae were created until the adult stage, being then sexed and identified. From the January and August samples 45 specimens were frozen for molecular assays (quantitative PCR - real-time) to detect the F1534C mutation in the voltage-regulated sodium channel gene, and F1 generation was also obtained for insecticide bioassays. The insecticides temephos (for larval trials), deltamethrin and malathion (for adults trials) were used and lethal concentrations (CL) 50 and 95 and resistance ratios were calculated. A total of 128.587 eggs of *Aedes* spp. were collected during the study period. We had the highest number of eggs in November 2015 (38.705), IDO of 248 and IMO of 215 eggs. In July 2015 the lowest number of eggs were obtained (10.411), with IDO and IMO of 85,3 and 57,8, respectively. The IPO remained similar throughout the year, with a maximum value of 86,7% and a minimum value of 63,9%. 13,237 specimens of *Ae. Albopictus*, with higher frequencies in the months of November 2015 and January and March 2016. *Ae. Albopictus* presented susceptibility in both high and low density vector bioassays to temephos (RR95 = 1,2 and 1,7), deltamethrin (RR95 = 3,0 and 2,3) and malathion (RR95 = 1,2 and 1,4). No mutant alleles were detected, only wild 1534 Phe + alleles. The results presented here suggest that *Ae. albopictus* occurs more frequently in the summer and is found not only in areas with higher vegetation cover, but also in the urbanized environment. Although still susceptible to insecticides evaluated, it showed a higher tolerance than the reference strain, suggesting that it may be under pressure with these products. Therefore, it is important to monitor the resistance of this potential vector in other locations.

ÍNDICE

RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Dengue	1
1.2 Chikungunya.....	4
1.3 Zika	8
1.4 <i>Aedes albopictus</i> como vetor de DENV e CHIKV	10
1.5 Aspectos gerais do <i>Ae. albopictus</i>	12
1.6 Estratégias de controle.....	13
1.7 Controle químico e resistência	14
1.8 Ilha de Paquetá	15
1.9 Justificativa.....	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Considerações éticas.....	19
3.2 Instalação das armadilhas.....	19
3.3 Quantificação de ovos de <i>Aedes</i> spp.....	20
3.4 Índice de positividade de ovitrampas, índice de densidade de ovos e índice médio de ovos.....	21
3.5 Dados meteorológicos.....	21
3.6 Criação de mosquitos	21
3.7 Bioensaios de susceptibilidade/ resistência do tipo dose-resposta com inseticidas.....	23
3.7.1 Bioensaio com larvas.....	23
3.7.2 Bioensaio com adultos.....	24
3.8 Genotipagem por PCR (real time) no sítio 1534 do gene <i>Nav</i> de <i>Ae. albopictus</i>	26
4 RESULTADOS	29

4.1	Frequência de ovos de <i>Aedes</i> spp. na Ilha de Paquetá.	29
4.2	Frequência e distribuição de <i>Ae. albopictus</i> na Ilha de Paquetá.	31
4.3	Avaliação do status de susceptibilidade/ resistência de <i>Ae. albopictus</i> da Ilha de Paquetá.	36
4.3.1	Susceptibilidade/ resistência à temephos em período de alta e de baixa densidade do vetor.	36
4.3.2	Susceptibilidade/ resistência à deltametrina em período de alta e de baixa densidade do vetor.	38
4.3.3	Susceptibilidade/ resistência à malathion em período de alta e de baixa densidade do vetor.	41
4.4	Frequência genotípica e alélica da mutação 1534 na população de <i>Ae. albopictus</i> na Ilha de Paquetá.	43
5	DISCUSSÃO	45
6	PERSPECTIVAS	51
7	CONCLUSÕES	52
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
9	ANEXOS	62
9.1	Licença da Comissão de Ética de Uso de Animais	62
9.2	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1-1: Distribuição mundial de casos de dengue até 2013, segundo a OMS.....	1
Figura 1.1-2: Casos prováveis de dengue no Brasil nos anos 2014, 2015 e 2016.....	2
Figura 1.1-3: Classificação de casos de dengue e níveis de gravidade.....	3
Figura 1.2-1: Distribuição mundial de casos de chikungunya até 2016, segundo o CDC.....	5
Figura 1.2-2: Distribuição dos casos de febre chikungunya no Brasil, em 2016.....	6
Figura 1.2-3: Manifestações de forma atípica de chikungunya.....	7
Figura 1.3-1: Casos autóctones e importados de Zika ao redor do mundo em 2015.....	8
Figura 1.3-2: Taxa de incidência (/100 mil habitantes) de febre pelo vírus Zika por município de notificação, até a semana epidemiológica 37, Brasil, 2016.....	9
Figura 1.4-1: Arbovirus possivelmente transmitidos por <i>Ae. albopictus</i>	11
Figura 1.5-1: <i>Aedes albopictus</i>	12
Figura 1.5-2: Mapa de distribuição geográfica do <i>Aedes albopictus</i> no Brasil em 2014.....	13
Figura 1.8-1: Ilha de Paquetá.....	16
Figura 3.2-1: Ovitampas instaladas na Ilha de Paquetá: (A) Ovitampa no intradomicílio (B) Ovitampa no peridomicílio.....	19
Figura 3.3-1: Análise das paletas no LAFICAVE. (A) Imagem obtida por lupa estereoscópica mostrando ovos na paleta. (B) Procedimento para contagem de ovos.....	20
Figura 3.6-1: Eclosão das larvas <i>Aedes</i> spp. e criação até a fase adulta. (A) Eclosão em copos. (B) Criação em bacias. (C) Criação em copos.....	22
Figura 3.6-2: Gaiola com mosquitos <i>Ae. albopictus</i>	22
Figura 3.6-3: Copos com ovos de <i>Ae. albopictus</i> colocados para secar em recipiente telado.....	23
Figura 3.7.1-1: Procedimentos para bioensaio com larvas. (A) Separação das larvas L3 em grupos de 20. (B) Copos com larvas expostas a inseticida.....	24
Figura 3.7.2-1: Aparato utilizado para impregnação de papéis.....	25

Figura 3.7.2-2: Tubos com fêmeas expostas a papel impregnado com inseticida.....	26
Figura 4.1-1: Número de ovos de <i>Aedes</i> spp. (n ovos- barras cinza), índice de positividade de ovitrampas (IPO –linha vermelha), índice de densidade de ovos (IDO –linha azul), índice médio de ovos (IMO- linha verde) e precipitação (precipitação – linha preta) na Ilha de Paquetá em coletas bimestrais ao longo de um ano.....	30
Figura 4.1-2: Correlação de temperatura e umidade com os índices IPO, IDO e IMO. Umidade média (azul escuro), temperatura média (rosa) índice de positividade de ovitrampas (IPO - vermelho), índice de densidade de ovos (IDO - azul) e índice médio de ovos (IMO-verde) na Ilha de Paquetá em coletas bimestrais ao longo de um ano.....	31
Figura 4.2-1: Frequência de <i>Ae. albopictus</i> obtidos de ovos das coletas bimestrais na Ilha de Paquetá nos meses de maio, julho, setembro e novembro de 2015 e janeiro e março de 2016.....	32
Figura 4.2-2: Distribuição espacial de <i>Ae. albopictus</i> na Ilha de Paquetá em maio (A), julho (B), setembro (C) e novembro (D) de 2015 e janeiro (E) e março (F) de 2016. Pontos em verde indicam presença e pontos em preto, ausência do mosquito.....	34
Figura 4.2-3: Distribuição espacial de <i>Ae. albopictus</i> em pontos e mapa via satélite da Ilha de Paquetá: (A) mapa via satélite da Ilha de Paquetá – Google maps e (B) Distribuição espacial de <i>Ae. albopictus</i> na Ilha de Paquetá em julho de 2015. Pontos em verde (presença) e pontos em preto (ausência).....	35
Figura 4.2-4: Distribuição espacial de <i>Ae. albopictus</i> em pontos e mapa via satélite da Ilha de Paquetá: (A) mapa via satélite da Ilha de Paquetá – Google maps e (B) Distribuição espacial de <i>Ae. albopictus</i> na Ilha de Paquetá em novembro de 2015. Pontos em verde (presença) e pontos em preto (ausência).....	36
Figura 4.3.1-1: Perfil da mortalidade em ensaios biológicos do tipo dose-resposta com temephos: linhagem Rockefeller (azul), <i>Ae. albopictus</i> (AD) (rosa) e <i>Ae. Albopictus</i> (BD) (verde) da Ilha de Paquetá (RJ, Brasil).....	38
Figura 4.3.2-1: Perfil da mortalidade em ensaios biológicos do tipo dose-resposta com deltametrina: linhagem Rockefeller (azul), <i>Ae. albopictus</i> (AD)	

(rosa) e <i>Ae. albopictus</i> (BD) (verde) da Ilha de Paquetá (RJ, Brasil).....	39
Figura 4.3.3-1: Perfil da mortalidade em ensaios biológicos do tipo dose-resposta com malathion: linhagem Rockefeller (azul), <i>Ae. albopictus</i> (AD) (rosa) e <i>Ae. albopictus</i> (BD) (verde) da Ilha de Paquetá (RJ, Brasil).....	42
Figura 4.4-1: Genotipagem para o sítio 1534 no Na_v de <i>Ae. albopictus</i> da Ilha de Paquetá. Ensaio de PCR em tempo real, método TaqMan, onde cada ponto representa a intensidade de sinal para cada alelo (Phe ⁺ ou Cys ^{kd^r}). Homozigoto selvagem (azul), homozigoto mutante (vermelho), heterozigoto (verde) e indeterminado (preto). Os controles positivos estão indicados com uma seta.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.8-1: Sequência de iniciadores e sondas usadas nas reações de genotipagem para o sitio1534 <i>Na_v</i> de <i>Aedes aegypti</i>	28
Tabela 4.1-1: Índices obtidos de coletas bimestrais na Ilha de Paquetá ao longo de um ano.....	29
Tabela 4.2-1: Número de mosquitos obtidos de ovos das coletas bimestrais na Ilha de Paquetá ao longo de um ano (2015/2016).....	32
Tabela 4.3.1-1: Concentração letal (mg/L) e razão de resistência entre <i>Ae. albopictus</i> da Ilha de Paquetá (RJ, Brasil) em período de alta e de baixa densidade e a linhagem Rockefeller, utilizando temephos.....	37
Tabela 4.3.2-1: Concentração letal (mg/m ²) e razão de resistência entre <i>Ae. albopictus</i> da Ilha de Paquetá (RJ, Brasil) em período de alta e de baixa densidade e a linhagem Rockefeller, utilizando deltametrina.....	39
Tabela 4.3.3-1: Concentração letal (mg/m ²) e razão de resistência entre <i>Ae. albopictus</i> da Ilha de Paquetá (RJ, Brasil) em período de alta e de baixa densidade e a linhagem Rockefeller, utilizando malathion.....	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>kdr</i>	<i>knockdown resistance</i>
Na _v	canal de sódio regulado por voltagem
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
IPO	Índice de Positividade de Ovitrapas
IDO	Índice de Densidade de Ovos
IMO	Índice Médio de Ovos
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dengue

Dengue é uma doença febril causada por vírus dengue de quatro sorotipos (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4), do gênero *Flavivirus*, os quais são transmitidos aos seres humanos através da picada de mosquitos *Aedes* infectados (Lourenço-de-Oliveira 2015_a, WHO 2016_a). A dengue está distribuída em países tropicais e subtropicais do planeta, como mostrado na figura 1.1-1, em regiões urbanas e semiurbanas.



Figura 1.1-1: Distribuição mundial de casos de dengue até 2013, segundo a OMS.

Figura adaptada de WHO 2014.

No Brasil a dengue tornou-se importante epidemiologicamente desde a década de 1980, atingindo de forma rápida todas as regiões do país (Braga & Valle 2007_a).

Segundo o boletim epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), em 2015 foram registrados no Brasil 1.649.008 casos prováveis de dengue, dos quais 21.898 casos e 863 óbitos foram confirmados (MS- Ministério da Saúde 2016_a). Em 2016, até 17/09/2016 foram registrados 1.438.624 casos de dengue, dos quais foram confirmados 8.211 casos e 563 óbitos (MS 2016_b).

A figura 1.1-2 mostra o número de casos de dengue no Brasil nos últimos três anos.

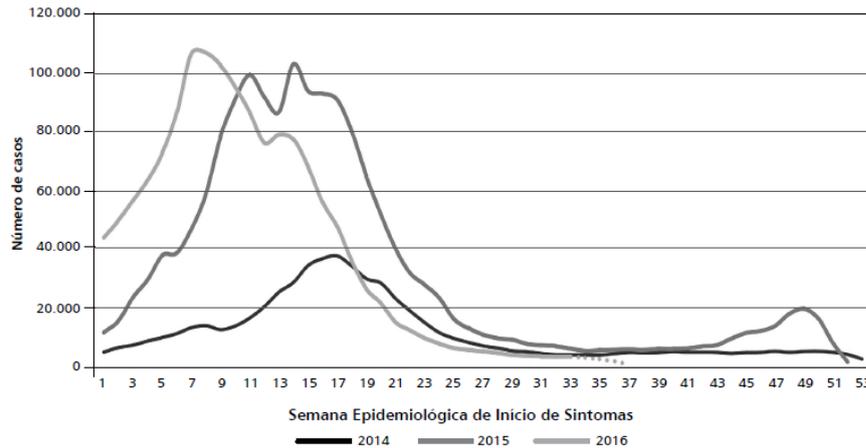


Figura 1.1-2: Casos prováveis de dengue no Brasil nos anos 2014, 2015 e 2016.

Fonte: Sinan online apud MS 2016_b.

Por muito tempo a dengue foi vista como duas doenças distintas: dengue clássica (ou febre de dengue) e dengue hemorrágica (ou febre hemorrágica de dengue). Atualmente, a dengue é reconhecida como uma doença única que pode ser assintomática ou se apresentar até mesmo de forma fulminante (Martínez 2008, OMS 2009).

A forma assintomática da dengue ocorre em altos índices do mundo (Bhatt e col. 2013), representa elevado percentual durante as epidemias e é reconhecida por teste sorológico, podendo haver poucas e leves manifestações (Dietz e col. 1990, Cunha e col. 1995). E um estudo, coordenado pelo Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais da Organização Mundial da Saúde (TDR/OMS), promoveu a reclassificação dos casos sintomáticos de dengue como mostrado na figura 1.1-3, baseado em critérios de gravidade clínica (Alexander e col. 2011).

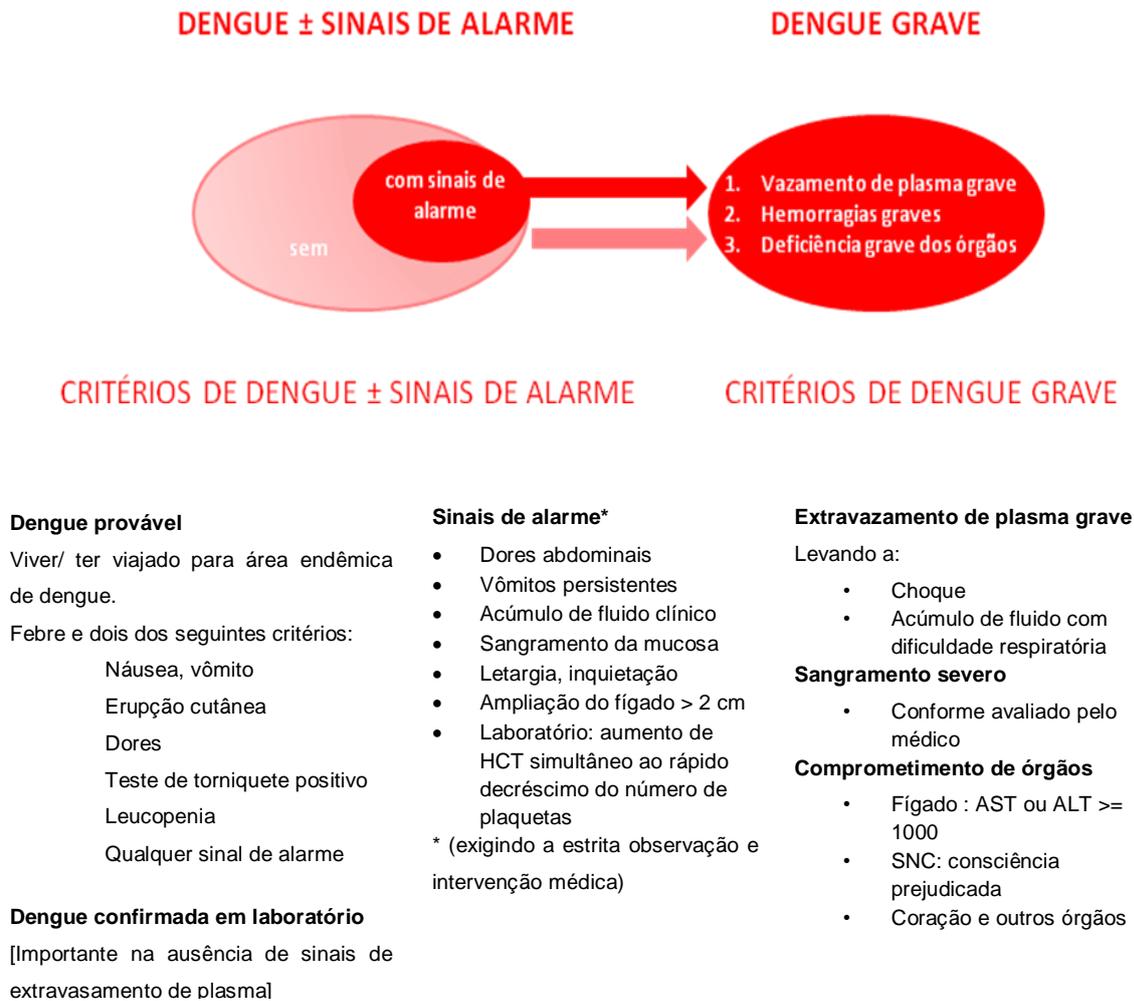


Figura 1.1-3: Classificação de casos de dengue e níveis de gravidade. Adaptado de OMS, 2009.

Considera-se atualmente a dengue grave e um desmembramento de dengue não grave para dengue sem sinais de alarme e dengue com sinais de alarme (WHO 2009) as quais, segundo Cunha & Martínez 2015, apresentam as seguintes características:

Dengue sem sinais de alarme: Apresenta manifestações de fase febril, que geralmente é a única fase da doença. Tem como característica febre associada à cefaleia, artralgias, mialgias e vômitos (WHO 1997). Outras possíveis manifestações são hiperemia da orofaringe, diarreia e dor abdominal discreta, petéquias, prostração e sudorese transitórias. Na maioria dos casos a fase dura cerca de uma semana, com boa evolução clínica, e o período de convalescença pode durar semanas, acompanhado de fraqueza e desânimo. Porém, nos casos de piora clínica, começam a surgir os sinais de alarme.

Dengue com sinais de alarme: Nesta fase há aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de líquido. Podem ocorrer derrames cavitários, dor abdominal intensa e contínua, elevação do hematócrito e redução de plaquetas, hepatomegalia, sangramento de mucosas, sonolência ou irritabilidade e vômitos persistentes. Alguns casos de dengue com sinais de alarme não reagem bem, mesmo com hidratação intravenosa, evoluindo então para a dengue grave (WHO 2012_a apud Cunha & Martínez 2015).

A vacina Dengvaxia® produzida pela empresa Sanofi Pasteur é, por enquanto, a única disponível no mundo para o controle da dengue, oferece proteção contra os quatro sorotipos do vírus porém, é indicada para o grupo de pessoas entre 9 e 45 anos de idade e apresenta baixa eficácia (que vai de 47,1% no caso do sorotipo 2 até 83,2% no caso do sorotipo 4) (Portal Brasil, 2016). Não há medicamento contra a dengue. O tratamento da dengue tem como objetivo o alívio dos sintomas, por isso, é necessário adotar formas de prevenção, as quais irão impedir o contato do mosquito vetor com o hospedeiro humano (MS- 2016_c).

1.2 Chikungunya

Chikungunya é uma doença causada pelo vírus chikungunya, de único sorotipo, gênero *Alphavirus*, o qual é transmitido aos seres humanos pelos mesmos mosquitos vetores dos vírus dengue (Lourenço-de-Oliveira 2015_b). Como mostra a figura 1.2-1, chikungunya está distribuída em países da África, Ásia, Europa, Oceania e Américas. Nas Américas, os primeiros casos foram identificados apenas a partir de 2013 (CDC 2016_b).

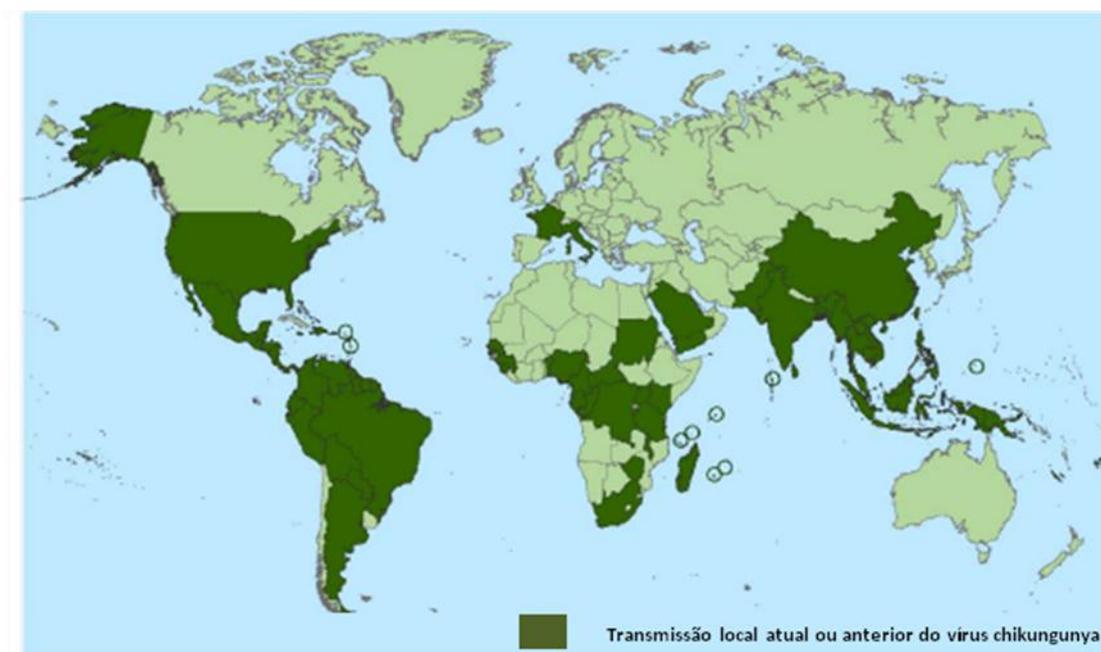
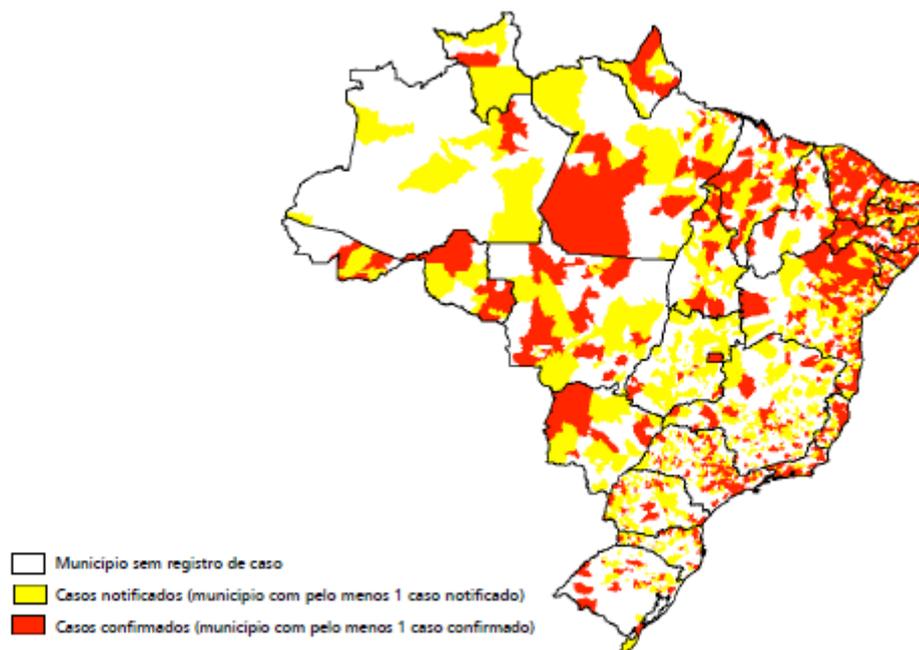


Figura 1.2-1: Distribuição mundial de casos de chikungunya até 2016, segundo o CDC. Figura adaptada do CDC 2016_b.

No Brasil, o primeiro caso autóctone de chikungunya foi identificado na cidade de Oiapoque (Amapá) em 2014 (MS 2015_a). Hoje, há casos confirmados de chikungunya em todos os estados brasileiros, como mostrado na figura 1.2-2 (MS 2016_b). Segundo a SVS, em 2015 foram notificados no Brasil 20.661 casos autóctones suspeitos de chikungunya, dos quais 7.823 casos e 3 óbitos foram confirmados (MS 2016_a). Em 2016, até 17/09/2016 foram registrados 236.287 casos de chikungunya, dos quais foram confirmados 116.523 casos e 120 óbitos (MS 2016_b).



Fonte: Sinan (atualizado em 19/09/2016).
 Dados sujeitos a alteração.

Figura 1.2-2: Distribuição dos casos de febre chikungunya no Brasil, em 2016. Fonte: MS 2016_b.

Chikungunya pode ser assintomática ou apresentar-se de forma sintomática. No caso sintomático, pode manifestar-se de forma típica (que inclui as fases aguda, subaguda e crônica) ou forma atípica (casos graves). Nos casos de forma típica as manifestações clínicas podem ser: febre, poliartralgia, dores nas costas, cefaleia, fadiga, bradicardia, exantema, prurido, manifestações cutâneas como dermatite esfoliativa, hiperpigmentação, úlceras orais, dor retro-ocular, conjuntivite, calafrios, fadiga, sintomas depressivos, alterações cerebelares e algumas destas podem variar de intensidade de acordo com a fase clínica. Os casos de forma atípica, em áreas com circulação do CHIKV, não apresentam febre ou dor articular, mas sim as manifestações que estão listadas na figura 1.2-3, que podem ser ocasionadas diretamente pelo vírus, resposta imunológica ou reação a medicamentos (MS 2015_a):

SISTEMA/ ÓRGÃO	MANIFESTAÇÕES
Nervoso	Meningoencefalite, encefalopatia, convulsão, Síndrome de Guillain- Barré, síndrome cerebelar, paresias, paralisias e neuropatias.
Olho	Neurite óptica, iridociclite, episclerite, retinite e uveíte.
Cardiovascular	Miocardite, pericardite, insuficiência cardíaca, arritmia e instabilidade hemodinâmica.
Pele	Hiperpigmentação por fotossensibilidade, dermatoses vesiculobolhosas, e ulcerações aftosa-like.
Rins	Nefrite e insuficiência renal aguda.
Outros	Discrasia sanguínea, pneumonia, insuficiência respiratória, hepatite, pancreatite, síndrome da secreção inapropriada do hormônio antidiurético e insuficiência adrenal.

Figura 1.2-3: Manifestações de forma atípica de chikungunya. Adaptado de MS 2015_a.

Diferentemente do perfil epidemiológico da dengue, chikungunya é sintomática em 70% dos casos. Os casos graves de chikungunya e óbitos, comumente, estão associados à idade extrema ou comorbidades (MS 2015_a).

Não há vacina para a prevenção de chikungunya, o tratamento não é específico mas sim direcionado aos sintomas. Por isso, tal como no caso da dengue, tornam-se necessárias medidas que evitem o contato do mosquito vetor do vírus chikungunya com os seres humanos (MS- 2016_c).

1.3 Zika

Zika é uma doença causada pelo arbovirus Zika, do gênero *Flavivirus*, que pode ser transmitida ao ser humano por mosquitos transmissores do DENV e do CHIKV, em regiões tropicais. É um vírus que circula na África, Ásia, Pacífico, América e gerou o primeiro surto no Brasil em 2015 (WHO 2016_b). A seguir o mapa de distribuição de casos de Zika, em 2015, segundo Basu & Tumban (2016):

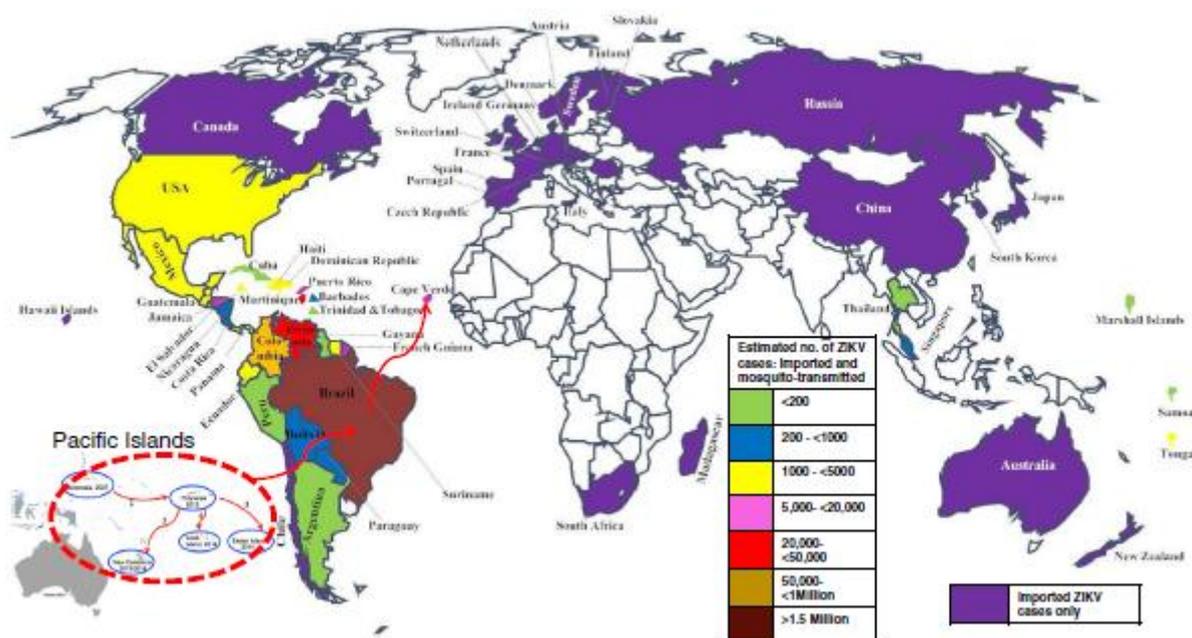


Figura 1.3-1: Casos autóctones e importados de Zika ao redor do mundo em 2015. Adaptado de: Basu & Tumban 2016.

Em 2016, até 17/09/2016 foram registrados 200.465 casos de Zika no Brasil, dos quais foram confirmados 109.596 casos e 3 óbitos. A figura a seguir (figura 1.3-2) mostra a taxa de incidência de Zika neste período em locais de todo o território nacional (MS 2016_b).

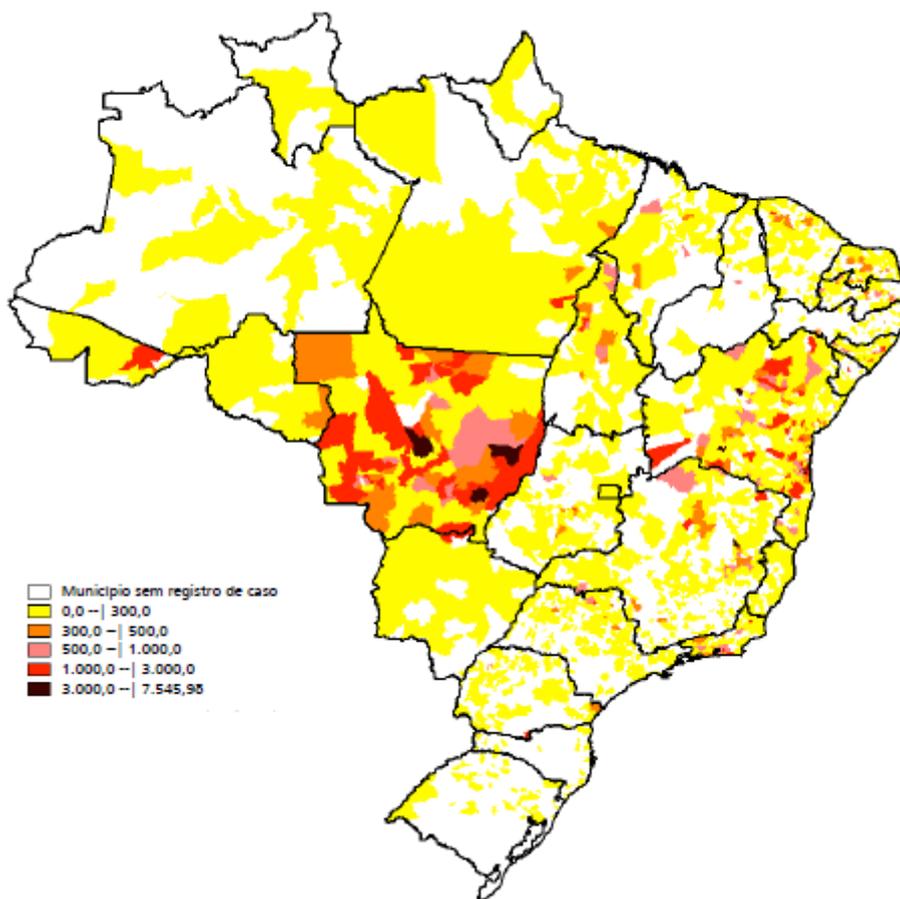


Figura 1.3-2: Taxa de incidência (/100 mil habitantes) de febre pelo vírus Zika por município de notificação, até a semana epidemiológica 37, Brasil, 2016. Fonte: MS 2016_b.

As manifestações clínicas da Zika geralmente são leves, tem duração de 2 à 7 dias e correspondem a exantema maculopapular (com prurido, na maioria dos casos), febre baixa, conjuntivite não purulenta, artralgia, mialgia, cefaleia, astenia, dor retro orbitária, edema periarticular, dor abdominal, úlceras orais, náuseas, diarreia e linfonodomegalia (SBI, 2016).

Outras manifestações que têm sido associadas a Zika são complicações no Sistema Nervoso Central (SNC) como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) e paralisia facial bilateral. Além disso complicações congênitas(oriundas de infecção durante a gravidez) como microcefalia e alterações no Sistema Nervoso Central (SNC) do feto (SBI, 2016).

Apesar da maior parte dos casos apresentarem evolução benigna, a maioria dos acometidos busca atendimento médico, especialmente pronto-socorros. Desta forma a epidemia de Zika colaborou significativamente com a superlotação dos estabelecimentos públicos de urgência e emergência (Luz e col. 2015).

Não há vacina contra ZIKV disponível até o momento, o tratamento baseia-se na regressão dos sintomas e, como forma de prevenção, usam-se medidas que possam evitar a interação do vetor com o hospedeiro humano (MS 2016_c).

1.4 *Aedes albopictus* como vetor de DENV e CHIKV

Embora o *Aedes aegypti* seja o principal vetor destes arbovirus, o *Ae. albopictus* tem mostrado potencial para transmitir DENV e CHIKV em diferentes locais do mundo, além de aproximadamente 20 arbovírus (vírus transmitidos por artrópodes), como listado na figura 1.4-1 (Paupy e col. 2009). Também é considerado possível vetor de ZIKV, como mostra um estudo realizado na Ásia (Wong e col. 2013).

ARBOVÍRUS	ISOLAMENTO DO CAMPO	COMPETÊNCIA VETORIAL	
		INFECÇÃO	TRANSMISSÃO
Dengue	Ásia, Américas e África	+	+
Febre Amarela	-	+	+
Oeste do Nilo	USA	+	+
Encefalite Japonesa	Taiwan	+	+
Saint Louis	-	+	+
Chikungunya	África, Indian Ocean, Ásia, Italy, USA	+	+
Encefalite Equina Leste	USA	+	+
Encefalite Equina Venezuelana	-	+	+
Encefalite Equina Oeste	-	+	+
Rio Ross	-	+	+
Sindbis	-	+	+
Mayaro	-	+	+
Getah	-	+	+
Potosi	USA	+	+
Cache Valey	USA	?	?
Tensaw	USA	?	?
Keystone	USA	+	-
San Angelo	-	+	+
La Crosse	USA	+	+
Jameston Canyon	USA	+	+
Trivittatus	-	+	-
Oropouche	-	+	-
Febre do Vale do Rift	-	+	+
Orungo (África)	-	+	+
Nodamura	-	+	?

Figura 1.4-1: Arbovirus possivelmente transmitidos por *Ae. albopictus*. Adaptado de: Paupy e col. 2009.

Ae. albopictus é vetor de DENV e CHIKV na China (Lu e col. 1997, Meng e col. 2015 apud Chen e col. 2016). No continente asiático e nas Ilhas do Pacífico, o *Ae. albopictus* provavelmente mantém a dengue em áreas rurais nos países onde essa doença é endêmica, atuando, dessa forma, como vetor secundário (Gratz 2004). Esse mosquito já foi identificado como vetor primário do CHIKV na África (Pagès e col. 2009).

No Brasil ainda não foi comprovado o papel como transmissor, mas estudos indicam seu potencial como vetor de DENV, CHIKV e ZIKV (Fiocruz 2008, Fiocruz 2016, Vega-Rúa e col. 2014).

1.5 Aspectos gerais do *Ae. albopictus*

Aedes albopictus é um inseto vetor que pertence à Ordem Diptera> Família Culicidae> Subfamília Culicinae> Gênero *Aedes* (Lourenço-de-Oliveira 2015_a) e suas formas adultas se diferenciam das outras espécies de *Aedes* por ter como característica principal uma faixa mediana longitudinal de escamas branco-prateadas no mesonoto, na região torácica (SUCAM - Superintendência de Campanhas de Saúde Pública 1989). A figura a seguir apresenta este culicidae com sua característica principal (figura 1.5-1).

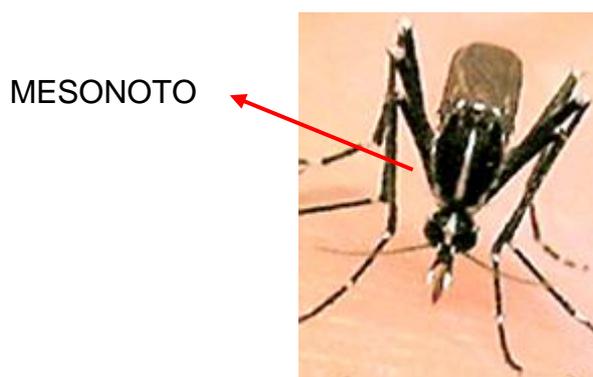


Figura 1.5-1: *Aedes albopictus*. Figura adaptada de CDC, 2016_a.

Ae. albopictus é um mosquito de origem asiática (Forattini 2002), apresenta grande potencial invasivo facilitado por sua plasticidade ecológica (Ngoagouni e col. 2015). O continente asiático é o que apresenta a maior parte das ocorrências deste vetor, em seguida o continente americano, sendo notória sua ocorrência também na África, Europa e Oceania. A dispersão do *Ae. albopictus* para locais como o norte dos Estados Unidos e sul do Brasil mostra sua capacidade em tolerar baixas temperaturas (Kraemer e col. 2015). No Brasil, o primeiro registro se deu em 1986, no Estado do Rio de Janeiro (Forattini 1986). Recentemente, a presença deste mosquito foi detectada em 3.285 municípios do Brasil e foi mostrada sua maior dispersão nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, conforme mostrado na Figura 1.5-2 (Carvalho e col. 2014).

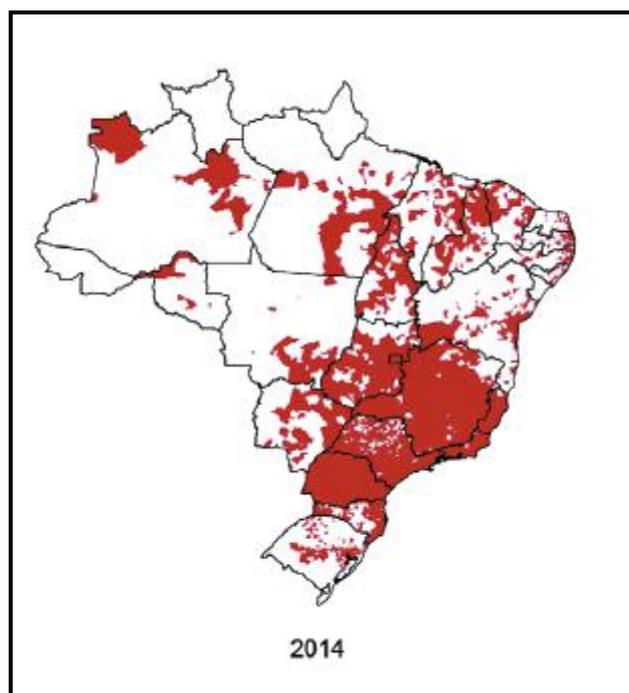


Figura 1.5-2: Mapa de distribuição geográfica do *Aedes albopictus* no Brasil em 2014. Fonte: Carvalho, Lourenço-de-Oliveira & Braga 2014.

Ae. albopictus é uma espécie encontrada em ambientes rurais, porém adaptada a ambientes domiciliares (FUNASA – Fundação Nacional de Saúde 2001). É frequentemente encontrado em regiões peridomiciliares como jardins (Braga & Valle 2007_b). As fêmeas de *Ae. albopictus* realizam oviposição preferencialmente em superfícies úmidas, com materiais rugosos e escuros, ou água misturada à matéria orgânica. O número de ovos dependerá da idade do mosquito fêmea e o número médio é cerca de 60 ovos por fêmea a cada postura (Forattini2002). Para tal, a alimentação sanguínea das fêmeas de *Ae. albopictus* envolve mamíferos, aves e humanos (FUNASA 2001). Em trabalho realizado no Rio de Janeiro, foi mostrado que o perfil de distribuição de *Ae. albopictus* possibilita a co-existência com *Ae.aegypti* quando em elevadas densidades na mesma região, especialmente com escassez de criadouros(Honório e col. 2009).

1.6 Estratégias de controle

Apesar das campanhas de controle de dengue, chikungunya e Zika no Brasil terem como foco o *Ae. aegypti*, manuais publicados pelo Ministério da Saúde vêm incluindo *Ae. albopictus* nas estratégias de controle. (FUNASA 2001, MS 2009).

É importante que a comunidade perceba o combate a vetores como uma atividade de interesse comum, adotando medidas que impeçam o acúmulo de água parada no ambiente e que visem à higienização de piscinas, caixas d'água e outros potenciais criadouros de vetores. Além disso, como parte do controle integrado de vetores, tem-se: controle biológico com utilização de peixes larvófagos ou microrganismos entomopatogênicos, controle químico com uso de inseticidas, manejo ambiental, manejo da resistência a inseticidas e, para isto, o monitoramento da resistência é importante (Robert 2001, FUNASA 2001).

O desafio atual para o controle desses vetores é que os mosquitos têm se tornado resistentes aos inseticidas utilizados (Kamgang e col. 2011).

1.7 Controle químico e resistência

Dentre os inseticidas químicos recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o organofosforado temephos é um dos larvicidas que foi mais utilizado no Brasil (WHO 2013). Atualmente a eficiência deste larvicida para *Ae. aegypti* está comprometida no Brasil devido à detecção de resistência a este organofosforado em diversos municípios (Lima e col. 2003, Marcoris e col. 2003). Já entre os adulticidas recomendados pela OMS, para os quais os mosquitos ainda apresentam susceptibilidade no Brasil, tem-se o organofosforado malathion já que a resistência a piretroides está instalada no Brasil (WHO 2012b, Linss e col. 2014).

Os organofosforados têm como alvo o sítio catalítico da acetilcolinesterase (ACHhE). Quando o organofosforado o atinge, impede-o de degradar o neurotransmissor acetilcolina, (neurotransmissor responsável pela propagação do impulso nervoso) (Ware & Whitacre 2004). O resultado é que o impulso nervoso do inseto não cessa, levando-o à depleção e à morte. Quando o inseto apresenta resistência a organofosforado, a afinidade à ACHhE é reduzida e o mecanismo de interrupção do impulso nervoso funciona de forma normal (Ferrari 1996, Ffrench-Constant 1998, Hemingway 2000).

Como forma de monitoramento, os bioensaios têm sido utilizados em diversas regiões do mundo para análise de susceptibilidade/ resistência de populações de mosquitos aos inseticidas (Lima e col. 2003, Kamgange col. 2011, Ishake col. 2015). Outro método bem utilizado para monitoramento é a detecção de alelos mutantes, que conferem resistência aos inseticidas (Kasai e col. 2011, Ishake col. 2015).

Os piretroides têm como alvo o canal de sódio regulado por voltagem (Na_v) e ao interagirem provocam o efeito “*knockdown*”, que gera paralisia e morte ao artrópode. O Na_v é uma proteína transmembranar constituída por quatro domínios homólogos (I a IV), cada um constituído por seis subunidades hidrofóbicas (S1-S6) (Davies e col. 2007). Mutações no gene codificante no Na_v são referidas como mutações “*knockdown resistance*” (*kdr*) e estão relacionadas à resistência a piretroide. A resistência permite que uma população de vetores entre em processo de evolução acelerado, respondendo à pressão seletiva com a sobrevivência dos indivíduos portadores de alelos de resistência (Braga & Valle 2007_b). Em *Ae. aegypti* essas mutações são bem conhecidas e comprovadamente relacionadas à resistência, por exemplo, a mutação *kdr* F1534C em que o aminoácido fenilalanina na posição 1534 é substituído pelo aminoácido cisteína. Esta mutação tem sido relacionada à resistência a piretroide em *Ae. aegypti* e um efeito adicional de resistência foi observado quando detectada também a mutação *kdr* V1016G neste vetor (Linss e col. 2014, Ishak e col. 2015).

Em *Ae. albopictus*, a mutação F1534C foi encontrada em populações de Singapura, I1532T na de Roma, F1534S nas do sul da China e Flórida e F1534L nas da Malásia e Estados Unidos, mas não comprovadamente todas estão relacionadas à resistência a piretroide (Kasai e col. 2011, Xu e col. 2016).

Num outro trabalho do nosso grupo, foram identificadas altas frequências de mutações *kdr* em *Ae. aegypti* de cerca de 20 localidades do Estado do Rio de Janeiro, com a menor delas observada na Ilha de Paquetá (Brito e col. 2013).

1.8 Ilha de Paquetá

A Ilha de Paquetá (Figura 1.8-1) está situada ao nordeste da Baía de Guanabara, no município do Rio de Janeiro, Brasil (22° 45' 35" S, 43° 06' 32" O). Apresenta área total de 1,2 km² e perímetro de 8km. Em sua maior extensão mede 2.316m, que vão da ponta do Lameirão à ponta do Imbuca. Em sua menor extensão mede 100m, na ladeira do Vicente. Há na Ilha cerca de 4.500 moradores fixos, parte destes trabalha na região metropolitana do Rio de Janeiro, parte trabalha nos órgãos públicos da Ilha, como COMLURB (Companhia Municipal de Limpeza Urbana) e CEDAE (Companhia Estadual de Águas e Esgotos) e parte com atividades de turismo e hotelaria lá desenvolvidas. A Ilha apresenta aproximadamente 2.200 domicílios distribuídos em 40 ruas, 12 praças, 2 parques e cerca

de 50% destes domicílios pertencem a veranistas, que para lá se deslocam nos finais de semana ou férias (Ilha de Paquetá 2015).



Figura 1.8-1: Ilha de Paquetá. Fonte: Governo do Estado do Rio de Janeiro, 2014.

Neste estudo, buscou-se analisar a distribuição espacial de *Ae. albopictus* na Ilha de Paquetá durante um ano, georreferenciando todas as áreas de coletas e elaborando mapas indicativos da densidade do vetor. Além disso, buscou-se avaliar o perfil de resistência/susceptibilidade em período de alta e baixa densidade e a frequência da mutação *kdr* desta população, colaborando assim, com dados importantes para o programa de controle desse vetor.

1.9 Justificativa

Aedes albopictus tem se destacado como um dos principais vetores ao redor do mundo. É um vetor presente no Rio de Janeiro e tem potencial para colaborar na transmissão dos vírus dengue, chikungunya e Zika, que causam doenças para as quais não há vacina, nem tratamento específico.

A Ilha de Paquetá, localizada no município do Rio de Janeiro, é uma região portuária, turística, com intenso fluxo de pessoas que podem estar infectadas com arbovírus como DENV e CHIKV e ZIKV, tornando possível epidemias dessas doenças pela presença de mosquitos como o *Ae. albopictus*, que tem potencial para realizar a transmissão vetorial. Como trata-se de uma região turística, é possível também que havendo surto dessas doenças naquela Ilha, sejam dispersadas através de pessoas lá

infectadas para outras localidades. Portanto, é importante que se faça o controle dos potenciais vetores nessa região. Com o conhecimento da distribuição espacial e os períodos de maior incidência do mosquito, pode-se elaborar e implementar novas estratégias de controle do *Ae. albopictus* de forma mais sistematizada e por ser uma área isolada, é possível que as ações tenham maior possibilidade de êxito de controle.

Já foi visto que *Ae. albopictus* pode se tornar resistente a piretroides, que são a base dos inseticidas de uso doméstico. O uso excessivo destes inseticidas é uma grave ameaça aos programas de controle, pois pode selecionar resistência nesta população. Portanto, conhecer se a população está ou não resistente bem como, os mecanismos moleculares de resistência envolvidos são de fundamental importância para uma escolha racional do inseticida a ser utilizado no seu controle.

Existem poucos trabalhos com avaliação de susceptibilidade/ resistência de *Ae. albopictus* no mundo, no Brasil e no Rio de Janeiro. Não detectamos na literatura trabalhos com esse enfoque particularmente na Ilha de Paquetá. Portanto, este é o primeiro trabalho com esta abordagem.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a distribuição espacial e o perfil de resistência do *Ae. albopictus* num estudo longitudinal de 12 meses na Ilha de Paquetá, RJ, Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

-Analisar a frequência e distribuição espacial de *Ae. albopictus* na Ilha de Paquetá bimestralmente ao longo de um ano.

-Avaliar o *status* de resistência de larvas e adultos de *Ae. albopictus*, em períodos considerados de alta e baixa densidade do vetor, aos inseticidas temephos, deltametrina e malathion.

- Estimar a frequência alélica da mutação *kdr* na população de *Ae. albopictus* da Ilha de Paquetá.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

O projeto englobou a instalação de armadilhas para coleta de ovos de *Aedes* spp. em campo e procedimentos laboratoriais, tais como: criação e triagem dos mosquitos adultos, bioensaios de susceptibilidade/resistência e ensaios moleculares. Não envolveu cobaias humanas. A utilização de cobaias (Linhagem/cepa Short Hair) para alimentação sanguínea dos mosquitos está respaldada pelo CEUA: LW-20/14 protocolos P-29/13-3. Aprovado em 31/03/14 com validade até 31/03/18.

3.2 Instalação das armadilhas

Neste projeto, armadilhas do tipo ovitrampa foram utilizadas para a coleta de ovos de *Aedes* spp. As ovitrampas consistem de um recipiente escuro plástico contendo 200 mL de uma solução de levedo de cerveja à 0.04% (como atrativo para as fêmeas) e uma paleta de Eucatex com a parte áspera voltada para a área interna para a oviposição. A coleta foi feita a cada dois meses por um período de 1 ano (05-2015/03-2016). A cada instalação, um total de 90 ovitrampas foram instaladas no intra ou peridomicílio de imóveis selecionados na Ilha de Paquetá (figura 3.2-1), essas ovitrampas permaneciam por duas semanas consecutivas, com a troca semanal das paletas. A distribuição espacial dessas armadilhas ocorreu de forma randômica, com maior número de armadilhas em quarteirões com maior número de imóveis, de forma a cobrir todo o espaço habitado da Ilha.



Figura 3.2-1: Ovitrampas instaladas na Ilha de Paquetá: (A) Ovitrampa no intradomicílio (B) Ovitrampa no peridomicílio.

Todos os imóveis onde houve a instalação das armadilhas foram georreferenciados com o uso de um aparelho GPS (*Global Positioning System*) portáteis do tipo GARMIN MP 62SC para a obtenção das coordenadas geográficas (Latitude e Longitude) com projeção UTM – SIRGAS 2000. Estas, foram inseridas e trabalhadas em um sistema de informação geográfica (SIG) no *software* QGIS 2.16.2, onde cada imóvel teve sua localização espacial gerada e identificada como um ponto (atributo) em uma camada (*shape*) da Ilha de Paquetá.

A avaliação da distribuição de *Ae. albopictus* pela Ilha de Paquetá foi realizada pela projeção de mapas temáticos de modelo vetorial. Estes mapas foram elaborados diante dos resultados das triagens de identificação das espécies encontradas em cada armadilha obtidos pelas coletas realizadas bimestralmente, sendo que a informação (atributo) inserida nos mapas foi a presença de *Ae. albopictus* em cada ovitrampa. Para tanto, foram projetados 6 mapas de distribuição da espécie pela Ilha de Paquetá.

3.3 Quantificação de ovos de *Aedes* spp.

A cada coleta as paletas foram encaminhadas ao Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (LAFICAVE) e colocadas para secar. Em seguida, foram analisadas por meio de utilização de lupa estereoscópica e contador manual, verificando-se a positividade e a contagem precisa dos ovos de *Aedes* spp. (figura 3.3-1).



Figura 3.3-1: Análise das paletas no LAFICAVE. (A) Imagem obtida por lupa estereoscópica mostrando ovos na paleta. (B) Procedimento para contagem de ovos.

3.4 Índice de positividade de ovitrampas, índice de densidade de ovos e índice médio de ovos.

Para se analisar os níveis de dispersão e de densidade dos ovos de *Aedes* spp. na Ilha de Paquetá, a cada coleta bimestral foram calculados, respectivamente, o índice de positividade de ovitrampas (IPO) o índice de densidade de ovitrampas (IDO) e o índice médio de ovos (IMO). Como descrito por Gomes (1998), o índice de positividade de ovitrampas é calculado pela razão entre o número de armadilhas positivas e o número de armadilhas examinadas multiplicado por 100, e o índice de densidade de ovitrampas é calculado pela razão entre o número de ovos e o número de armadilhas positivas. Calculamos também o Índice Médio de Ovos (IMO) calculado pela razão entre o número de ovos coletados e o número de armadilhas instaladas.

3.5 Dados meteorológicos

Os índices de pluviosidade, temperatura e umidade da Ilha de Paquetá foram obtidos da fonte de dados da rede do INMET para as análises de relação entre clima e índices quantitativos de ovos *Aedes* spp.

Para a elaboração dos gráficos foi usado o Microsoft Office Excel 97-2003.

3.6 Criação de mosquitos

Após a contagem dos ovos, as paletas foram colocadas individualmente em copos e imersas em 200 mL de água desclorada para eclosão dos ovos. As larvas foram criadas até a fase adulta, quando foram sexadas e identificadas a nível de espécie. Todas as larvas foram alimentadas com ração para gatos triturada (Friskies- Purina®), todos os adultos foram alimentados com solução de açúcar a 10% e, em todos os estágios, criados em insetário à temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\pm 10\%$ (figura 3.6-1).

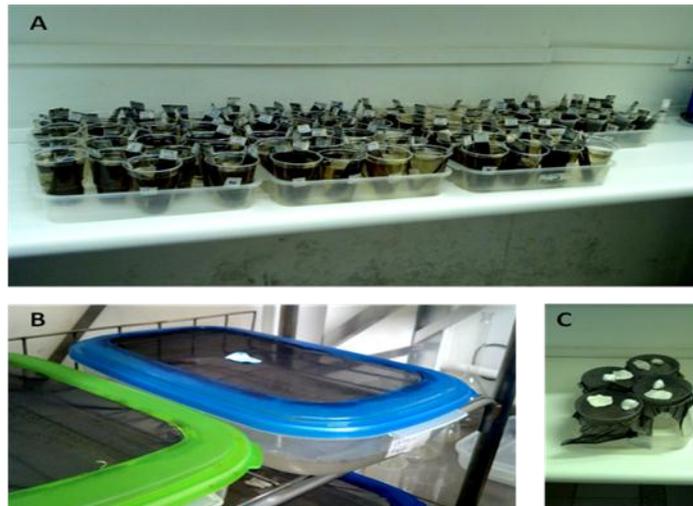


Figura 3.6-1: Eclosão das larvas *Aedes* spp. e criação até a fase adulta. (A) Eclosão em copos. (B) Criação em bacias. (C) Criação em copos.

Em duas destas coletas, uma na estação chuvosa (verão) e outra na estação seca (inverno), uma amostra aleatória de 45 espécimes de *Ae. albopictus* foi separada em criotubos e conservada em freezer -80°C para posteriores análises moleculares de identificação da frequência da mutação *kdr*.

Os espécimes restantes de *Ae. albopictus* foram reunidos em gaiolas de papelão (17cm de diâmetro X 18cm de altura) para obtenção de ovos da geração F1 utilizadas na realização dos bioensaios. Quando o número de ovos da geração F1 não foi suficiente para realizar todos os ensaios, parte da geração F1 foi utilizada para a obtenção da geração F2, as quais foram utilizadas para os bioensaios com inseticidas (figura 3.6-2).



Figura 3.6-2: Gaiola com mosquitos *Ae. albopictus*.

Para a obtenção de postura, as fêmeas foram alimentadas com sangue de cobaias de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais, da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA- Fiocruz). A alimentação sanguínea foi realizada

semanalmente durante 1 mês, com retirada prévia da solução de açúcar das gaiolas (no dia anterior) e recolocação após a utilização das cobaias. Os cobaias eram anestesiados e permaneciam sobre a gaiola por 30 minutos. Três dias após, copos plásticos escuros contendo água desclorada e papel filtro revestindo a parede interna foram inseridos nas gaiolas para oviposição. Depois de três dias, os copos foram retirados e colocados em bacias teladas para secar (figura 3.6-3). Três dias depois, os papéis filtro secos contendo os ovos F1 (ou F2) foram guardados em envelopes de papel dentro de uma vasilha de plástico, a qual foi mantida em insetário à temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\pm 10\%$.



Figura 3.6-3: Copos com ovos de *Ae. albopictus* colocados para secar em recipiente telado.

Ovos de *Aedes aegypti* da linhagem susceptível de referência Rockefeller, foram obtidos da colônia do LAFICAVE, a qual é mantida seguindo o protocolo de manutenção de *Ae. aegypti* em laboratório (POP-LAFICAVE-BIO-002).

3.7 Bioensaios de susceptibilidade/ resistência do tipo dose-resposta com inseticidas.

3.7.1 Bioensaio com larvas

Para os ensaios biológicos com larvas foi utilizado o inseticida organofosforado (OP) temephos (Sigma Aldrich®) seguindo o protocolo adaptado da metodologia da OMS (1981).

Para a obtenção de eclosão sincronizada, os papéis filtro com ovos foram postos em copos descartáveis de 50 mL com água de criação, que é obtida de um recipiente com larvas em processo de criação, por 4hs (1h no caso da linhagem Rockefeller) e em seguida as larvas foram vertidas em bacias (33 x 24 x 8 cm) contendo 1L de água desclorada e 1g de ração. As larvas foram criadas por 3-4 dias na proporção de 300 larvas por 1L de água desclorada. Ao alcançarem o estágio L3, foram separadas em grupos de 20 para os ensaios com inseticida.

Foram utilizadas 20 larvas L3 em quadruplicata para cada concentração do inseticida (figura 3.7.1-1). As mesmas larvas foram expostas a, no mínimo, sete diferentes concentrações de temephos, em volume final de 100 mL, por 24 h. Como controle, 20 larvas em quadruplicata foram expostas a água desclorada e álcool com o mesmo volume final. O ensaio foi repetido três vezes, em dias diferentes. A leitura dos ensaios foi feita após as 24 h de exposição ao inseticida.

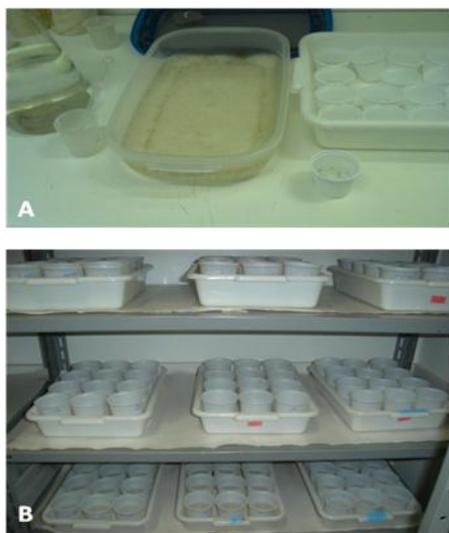


Figura 3.7.1-1: Procedimentos para bioensaio com larvas. (A) Separação das larvas L3 em grupos de 20. (B) Copos com larvas expostas a inseticida.

3.7.2 Bioensaio com adultos

Para os ensaios biológicos com adultos foram utilizados os inseticidas piretroide (PI) deltametrina (SigmaAldrich®) e organofosforado (OP) malathion (De Sangosse Agroquímica LTDA), em papel impregnado Whatman®, seguindo o protocolo adaptado da metodologia OMS 1998. Os papeis foram impregnados, com no mínimo sete diferentes concentrações do inseticida em acetona e óleo de silicone, segundo metodologia

desenvolvida no Laficave, que consiste de um aparato contendo 168 orifícios equidistantes e coincidente com o espaço das ponteiros de uma pipeta multicanal, que é utilizada para fazer esta impregnação. Após a impregnação os papéis foram armazenados em estantes para secagem por cerca de três dias e só então puderam ser utilizados para os bioensaios. O aparato é mostrado na figura a seguir (3.7.2-1).

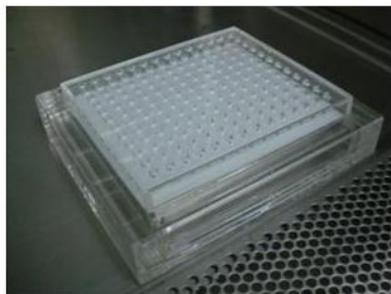


Figura 3.7.2-1: Aparato utilizado para impregnação de papéis.

Para os ensaios, duas semanas antes, papéis filtro com ovos foram postos em bacias contendo 1L de água desclorada e 1g de ração. As larvas foram criadas por cerca de sete dias na proporção de 300 larvas por 1L de água desclorada, com reposição de ração a cada três dias ou quando necessário. Ao alcançarem o estágio de pupa, foram separadas em gaiolas de papelão contendo solução de açúcar a 10% para a alimentação dos adultos emergentes. A emergência das fêmeas se deu em 2-3 dias.

Na montagem do ensaio, foram utilizadas triplicatas de 15 a 25 fêmeas, com três a cinco dias de emergidas, não alimentadas com sangue, as quais foram expostas a papéis impregnados com, no mínimo, sete diferentes concentrações de deltametrina ou malathion por 1 h em tubos do Kit OMS (figura 3.7.2-2), conforme metodologia em uso para o PNCD (Programa Nacional de Controle de Dengue). Após esse tempo foram transferidas para tubos descanso (sem papel impregnado com inseticida) nos quais permaneceram por 24 h com algodão molhado com solução de açúcar. Como controle, um grupo de fêmeas em triplicata foi exposto somente ao silicone, o solvente usado na impregnação dos papéis. As leituras foram feitas após 24 h. Os ensaios foram repetidos três vezes, em dias diferentes.



Figura 3.7.2-2: Tubos com fêmeas expostas a papel impregnado com inseticida.

Ao final de todos os bioensaios, por meio da transformação \log_x Probit, foram calculadas as concentrações letais (CL) 50 e 95 pelo *software* desenvolvido por Raymond (1985). Para os cálculos de razão de resistência (RR), dividiu-se o valor da CL da população de Paquetá pela CL da linhagem susceptível de referência Rockefeller, referente as CL_{50} e CL_{95} . Os gráficos foram elaborados com o *software* GraphPadprism 6.

Para classificar o status de resistência, foi utilizado o critério recomendado pelo PNCD (Programa Nacional de Controle da Dengue), o qual considera resistentes as populações com RR_{95} acima de 3,0 (Brasil, 2006 apud Bellinato e col. 2016).

3.8 Genotipagem por PCR (real time) no sítio 1534 do gene Na_V de *Ae. albopictus*

Os 90 espécimes de *Ae. albopictus* (45 do período de chuvas e 45 do período de seca) conservados em freezer (-80°C) foram submetidos à extração do DNA genômico seguindo o protocolo adaptado de extração de DNA TNES (Tris-HCl 0,25 M; NaCl 2 M; EDTA 0,1M; SDS 2,5% pH 7,5), de acordo com Martins e col., (2007). As etapas estão expostas a seguir:

Os espécimes foram macerados, individualmente, em $50\mu\text{L}$ de tampão TNES e $2\mu\text{L}$ de proteinase K(20mg/mL), para a remoção de proteínas associadas ao DNA. Em seguida foram adicionados mais $200\mu\text{L}$ de TNES. Os macerados foram incubados em banho-maria a 56°C overnight. No dia seguinte foram adicionados $100\mu\text{L}$ de solução de precipitação de proteína (NaCl 5M), seguindo-se de homogeneização em vortex Scilogex

MX-S por 20 segundos e centrifugação em centrífuga Thermo Scientific por 6 minutos à 15.000g a 20°C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos, aos quais foram adicionados 300µL de isopropanol 100%. As amostras foram agitadas, suavemente, por inversão, centrifugadas por 5 minutos à 15.000g e 20°C, quando então tiveram os sobrenadantes cuidadosamente descartados, com auxílio de uma pipeta de 200 µL. Foram adicionados 300µL de etanol 70% às amostras e estas foram, novamente, centrifugadas por 6 minutos à 15.000g e 20°C. Os sobrenadantes foram totalmente descartados e os microtubos foram postos vertidos em papel absorvente para a eliminação de todo o etanol. Os precipitados secaram em forno à 60°C por 10 minutos, hidratados com 50 µL de TE (Tris HCl 1M pH 7.4-8.0) 1X e aquecidos em forno por 15 minutos à 96°C.

As reações de PCR quantitativo (em tempo real) foram feitas conforme adaptação do protocolo TaqMan® SNP Genotyping Assays, previamente desenvolvida no laboratório para genotipagem dos alelos 1534 Phe⁺ e 1534 Cys^{*kdr*} em *Ae. aegypti*. Como observamos que as regiões de anelamento de *primers* e sondas deste ensaio eram idênticas às de populações brasileiras de *Ae. albopictus* (Obano-Aguirre e col., no prelo), aplicamos as mesmas condições para *Ae. albopictus*.

Como controles positivos foram utilizados DNAs extraídos de *Aedes aegypti*: Rockefeller (para o genótipo 1534 Phe/Phe), Rockefeller-*kdr* (para o genótipo 1534 Cys/Cys) e a mistura de ambos em concentrações equimolares (para o genótipo 1534 Phe/Cys). Como controle negativo foram deixados 3 poços sem DNA.

As reações foram realizadas em microplacas ópticas de 96 poços, tendo 10µL de volume total de cada reação, contendo 1µL do DNA molde e 9µL da seguinte mistura: 500µL de Genotyping Master Mix 2X, 6,25µL de Taqman SNP e 393,75µL de água Milli-Q. A reação foi amplificada em termociclador em tempo real (Applied Biosystems by Life Technologies QuantStudio 6Flex, CA-USA) programado para 50 ciclos de: 95 °C (para desnaturação) por 15 segundos e 60 °C (para anelamento e extensão) por 1 minuto. O resultado foi analisado por Software QuantStudio real time PCR v1.1. As sequências dos *primers* e sondas encontram-se na tabela 3.8-1.

Tabela 3.8-1: Sequência de iniciadores e sondas usadas nas reações de genotipagem para o sitio1534 *Na_v* de *Aedes aegypti*.

NOMES DOS PRIMERS E SONDAS	SEQUENCIA (5'-3')
1534 iniciador sensu (<i>primer forward</i>)	CGAGACCAACATCTACATGTACCT
1534 iniciador anti sensu (<i>primer reverse</i>)	GATGATGACACCGATGAACAGATTC
1534 sonda (<i>probe</i>) Phe ⁺	FAM-ACGACCCGAAGATGA-NFQ
1534 sonda (<i>probe</i>) Cys ^{<i>kat</i>}	VIC-AACGACCCGCAGATGA-NFQ

Fórmula para obtenção das frequências genotípicas:

$$F(x) = \frac{\text{número de indivíduos com o genótipo } x}{\text{número total de indivíduos}}$$

Fórmula para obtenção das frequências alélicas:

$$F(A) = \frac{2x \text{ n}^\circ \text{ de indivíduos com genótipo AA} + \text{n}^\circ \text{ de indivíduos com genótipo Aa}}{2x \text{ n}^\circ \text{ total de indivíduos}}$$

$$F(a) = \frac{2x \text{ n}^\circ \text{ de indivíduos com genótipo aa} + \text{n}^\circ \text{ de indivíduos com genótipo Aa}}{2x \text{ n}^\circ \text{ total de indivíduos}}$$

4 RESULTADOS

4.1 Frequência de ovos de *Aedes* spp. na Ilha de Paquetá.

Foram instaladas 1.080 armadilhas do tipo ovitrampa na Ilha de Paquetá no período de um ano, destas, 833 foram positivas e foram coletados 128.587 ovos de *Aedes* spp. no período. Observamos uma variação no número de ovos coletados entre os períodos, verificamos que novembro de 2015 e janeiro de 2016 foram os meses com maior número de ovos e que julho de 2015 e setembro de 2015 foi coletado o menor número. Não observamos uma grande variação no (IPO) entre os períodos, no entanto, julho de 2015 e setembro de 2015 foram os meses que apresentaram menor positividade, ao contrário de novembro de 2015 e janeiro de 2016 que apresentaram maior positividade. O índice de densidade de ovos (IDO) variou de 248 ovos em novembro de 2015 a 85 em julho de 2015. Resultado semelhante foi observado para o índice médio de ovos (IMO) que variou de 215 ovos em novembro de 2015 a 58 em julho de 2015 (Tabela 4.1-1).

Tabela 4.1-1: Índices obtidos de coletas bimestrais na Ilha de Paquetá ao longo de um ano.

Meses	Ovitampas instaladas	Ovitampas positivas	Número de ovos	IPO(%)	IDO	IMO
mai/15	180	145	12.922	80,6	89,1	71,8
jul/15	180	122	10.411	67,8	85,3	57,8
set/15	180	115	11.196	63,9	97,4	62,2
nov/15	180	156	38.705	86,7	248,1	215,0
jan/16	180	153	33.198	85,0	217,0	184,4
mar/16	180	142	22.155	78,9	156,0	123,1
Total	1.080	833	128.587	77,1	154,4	119,1

*IPO (Índice de positividade de ovitampas)

*IDO (Índice de densidade de ovos)

*IMO (Índice médio de ovos)

Na Figura 4.1-1 podemos ver claramente dois períodos com menor precipitação nos meses de maio, julho e setembro de 2015 e os meses de maior precipitação novembro de 2015 e janeiro e março de 2016. Podemos notar ainda que, o IDO e o IMO

acompanham esta tendência, ou seja, são mais baixos nos meses de menor precipitação e mais altos nos meses com maior precipitação. Com relação a positividade das armadilhas não observamos grandes variações nos dois períodos.

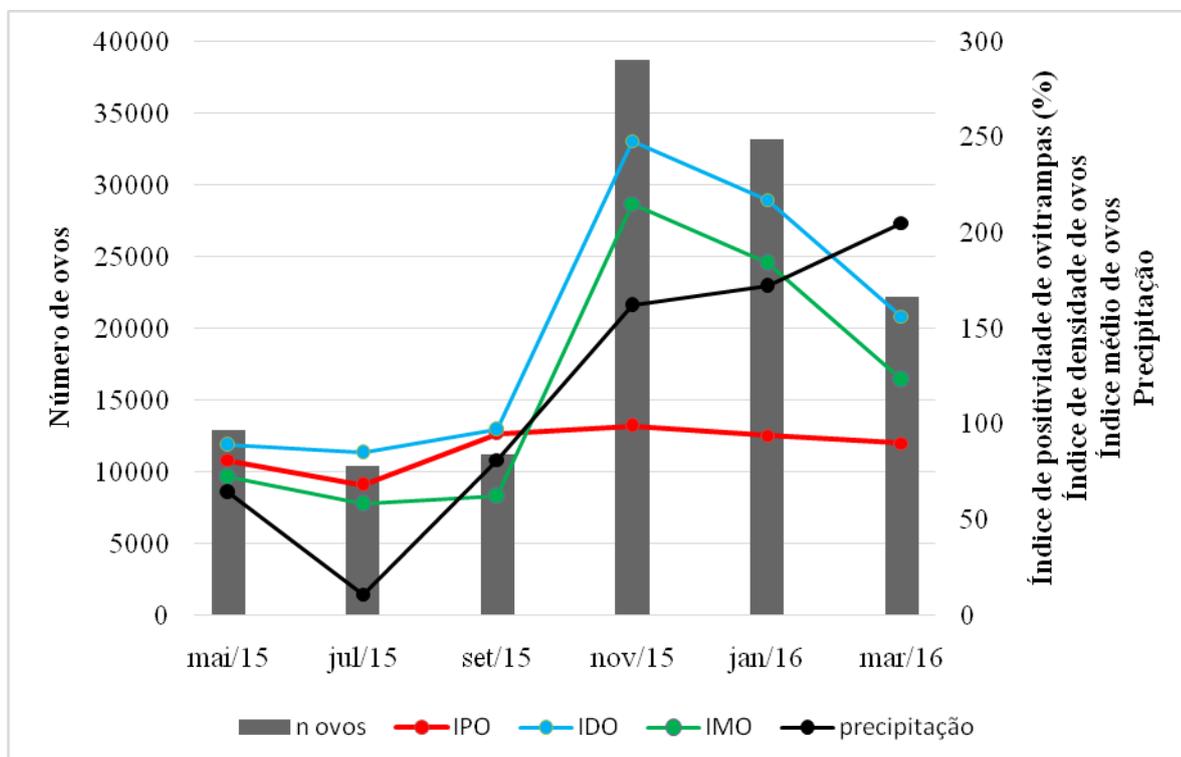


Figura 4.1-1: Número de ovos de *Aedes* spp. (n ovos- barras cinza), índice de positividade de ovitrampas (IPO – linha vermelha), índice de densidade de ovos (IDO – linha azul), índice médio de ovos (IMO- linha verde) e precipitação (precipitação – linha preta) na Ilha de Paquetá em coletas bimestrais ao longo de um ano.

Com relação a temperatura, não foi observado grandes variações no decorrer do estudo, não sendo possível observar qualquer relação com o número de ovos coletados e nem com os índices avaliados IPO, IDO e IMO, o mesmo podemos observar com a umidade onde também não houve variações que pudessem ser correlacionadas com o número de ovos coletados e com os índices avaliados IPO, IDO e IMO (Figura 4.1-2)

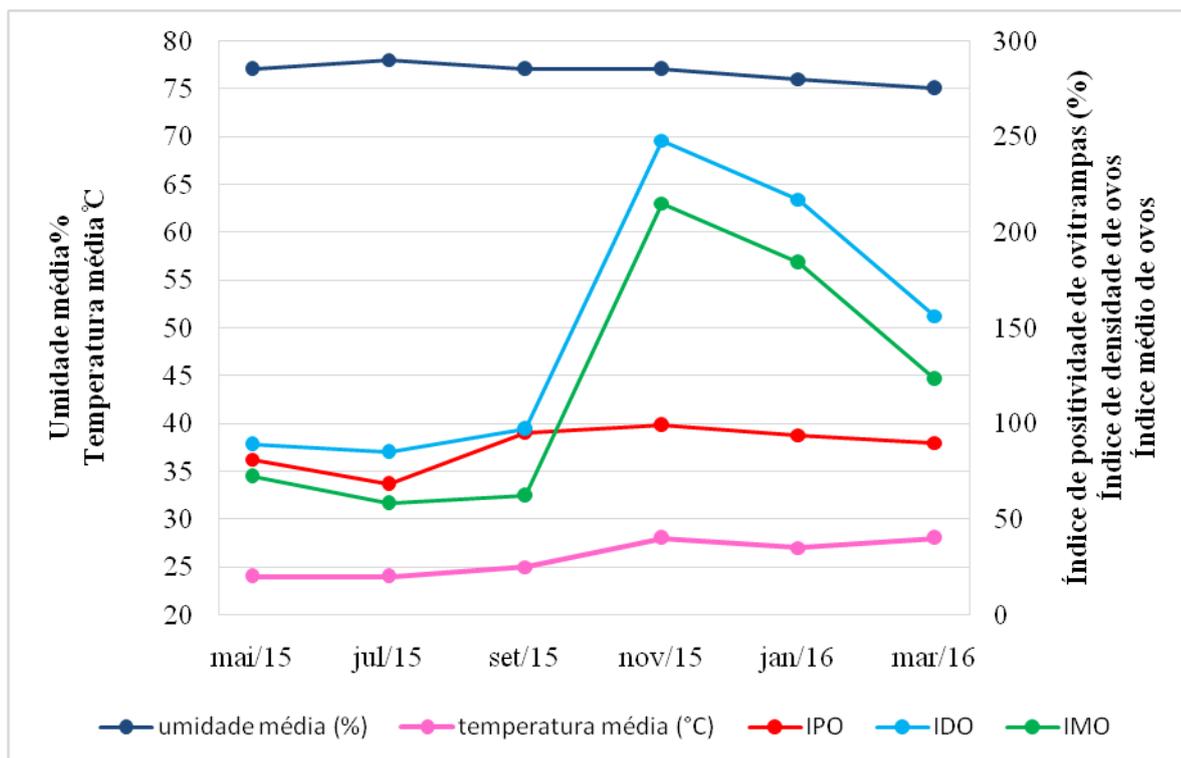


Figura 4.1-2: Correlação de temperatura e umidade com os índices IPO, IDO e IMO. Umidade média (azul escuro), temperatura média (rosa) índice de positividade de ovitampas (IPO - vermelho), índice de densidade de ovos (IDO - azul) e índice médio de ovos (IMO-verde) na Ilha de Paquetá em coletas bimestrais ao longo de um ano.

4.2 Frequência e distribuição de *Ae. albopictus* na Ilha de Paquetá.

Foram obtidos 36.820 espécimes de *Aedes* spp. na Ilha de Paquetá, a partir dos ovos coletados, no período de um ano, destes, 13.237 foram identificados como *Ae. albopictus*. Constatamos uma variação no número de mosquitos obtidos entre os períodos, verificamos que maio e novembro de 2015 e janeiro e março de 2016 foram os meses com maior número de *Ae. albopictus* e que em julho e setembro de 2015 foi obtido o menor número (tabela 4.2-1).

Tabela 4.2-1: Número de mosquitos obtidos de ovos das coletas bimestrais na Ilha de Paquetá – RJ ao longo de um ano (2015/2016).

MESES	Nº de <i>Aedes</i> spp.	Nº de <i>Ae. albopictus</i> (%)
Maio de 2015	7.593	2.278 (30)
Julho de 2015	3.757	1.311 (34,9)
Setembro de 2015	5.689	1.463 (25,7)
Novembro de 2015	7.923	2.479 (31,3)
Janeiro de 2016	6.000	2.670 (44,5)
Março de 2016	5.858	3.036 (51,8)
TOTAL	36.820	13.237 (35,9)

Os dados representados na figura 4.2-1 mostram que houve variação no número de *Ae. albopictus* obtidos no decorrer dos meses, porém, em julho e setembro de 2015 foram os meses que apresentaram menor densidade.

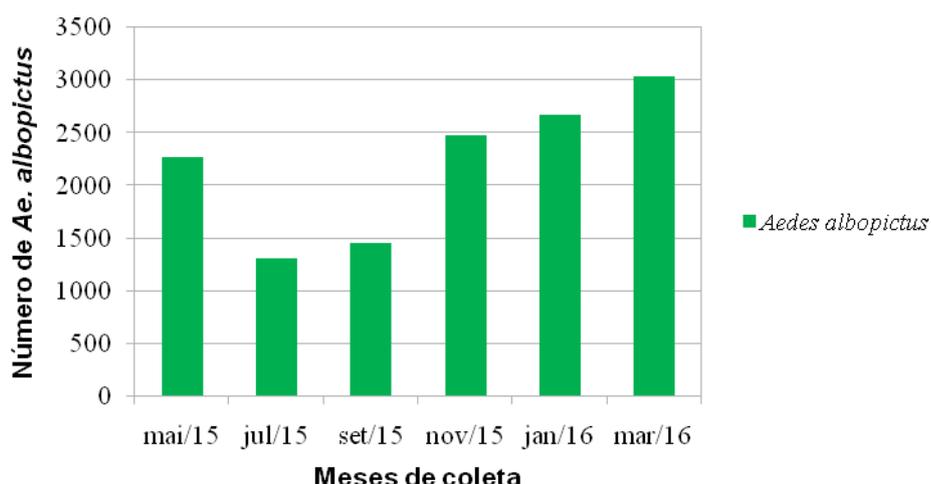


Figura 4.2-1: Frequência de *Ae. albopictus* obtidos de ovos das coletas bimestrais na Ilha de Paquetá – RJ nos meses de maio, julho, setembro e novembro de 2015 e janeiro e março de 2016.

Quanto à distribuição pela Ilha de Paquetá, pode-se verificar que a presença de *Ae. albopictus* foi detectada em diferentes pontos por toda a Ilha, sendo o menor número de pontos nos meses de maio, julho e setembro de 2015 e em maior número de pontos nos meses novembro de 2015 e janeiro e março de 2016. Verificamos que embora haja uma variação no número de pontos no decorrer do período avaliado, o *Ae. albopictus* encontrou-se dispersado por toda a Ilha de Paquetá em todos os períodos.

Quando avaliamos a presença do *Ae. albopictus* na Ilha de Paquetá, verificamos que o mês de novembro de 2015 foi o que apresentou ocorrência de positividade no maior número de pontos, 78 (86,7%) dos 90 avaliados, seguido de janeiro e março de 2016 com 72 (80%) e 71 (78,9%) respectivamente. Já os meses de maio, julho e setembro de 2015 embora tenham apresentado alta frequência, foram os meses com presença de ovos de *Ae. albopictus* num menor número de pontos dos 90 avaliados 67 (74,4%), 61 (67,8%) e 59 (65,6%) respectivamente (como mostra a figura 4.2-2).

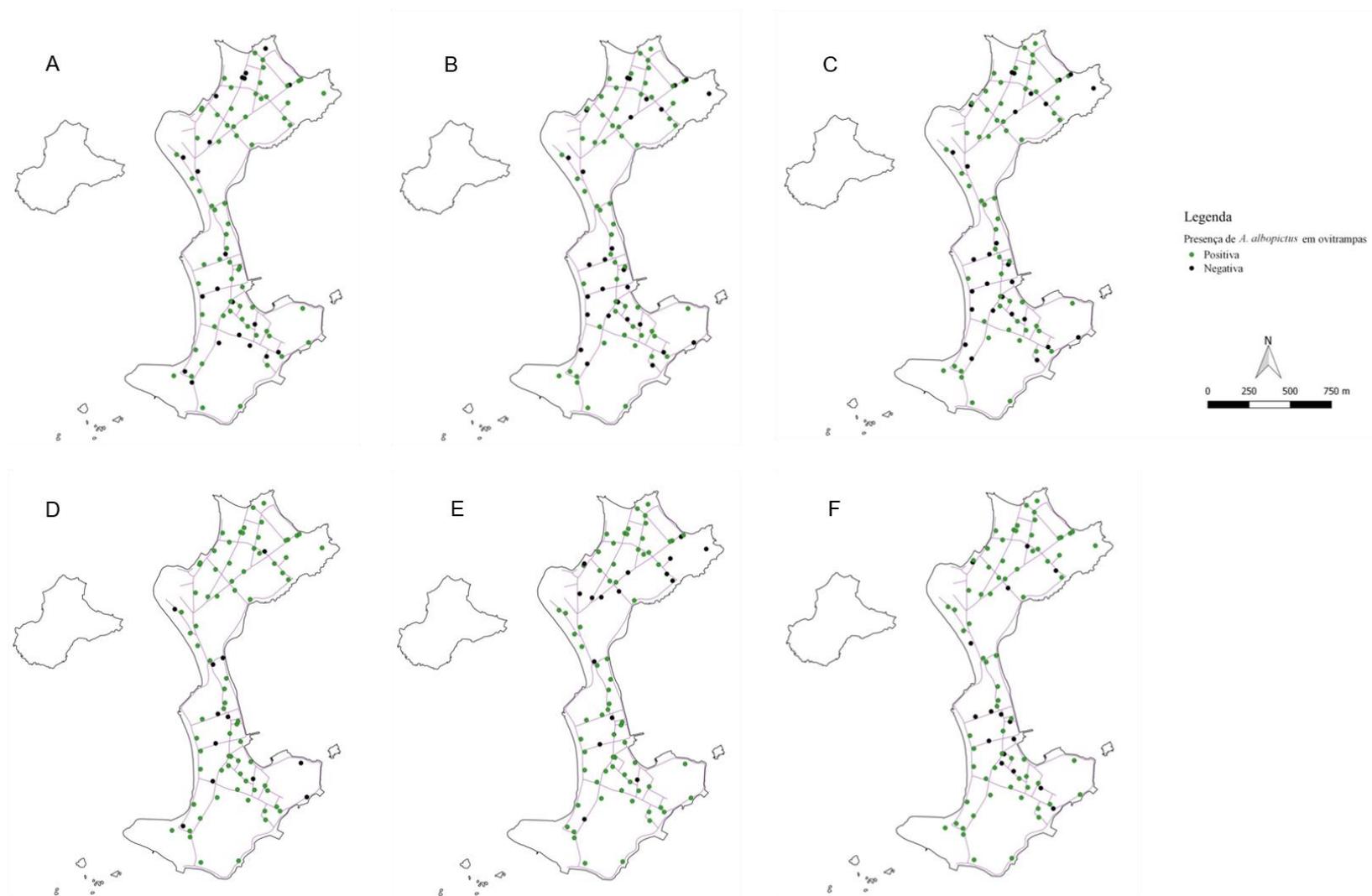


Figura 4.2-2: Distribuição espacial de *Ae. albopictus* na Ilha de Paquetá em maio (A), julho (B), setembro (C) e novembro (D) de 2015 e janeiro (E) e março (F) de 2016. Pontos em verde indicam presença e pontos em preto, ausência do mosquito.

Nas Figuras 4.2-3 e 4.2-4 podemos ver que a Ilha de Paquetá apresenta fragmentos com grande cobertura vegetal, apesar de apresentar também áreas com pouca vegetação. É possível notar também que, independente do período com maior ou menor presença de *Ae. albopictus*, este esteve presente tanto em áreas com maior cobertura vegetal, quanto naquelas com menor cobertura vegetal, mostrando uma distribuição por toda a Ilha.

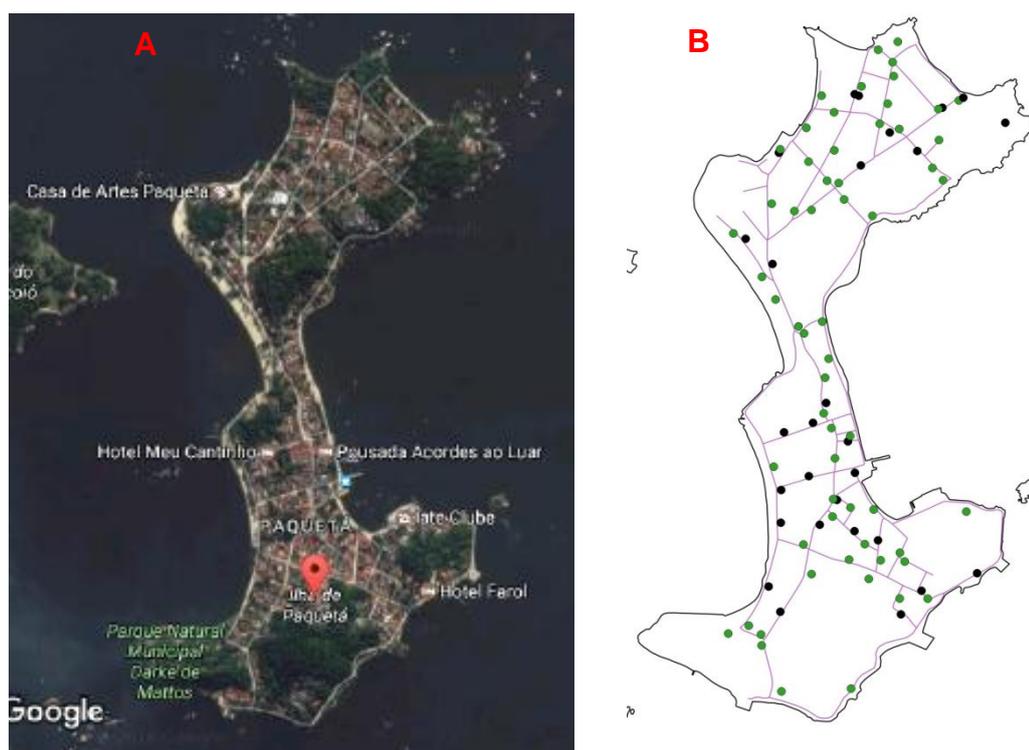


Figura 4.2-3: Distribuição espacial de *Ae. albopictus* em pontos e mapa via satélite da Ilha de Paquetá: (A) mapa via satélite da Ilha de Paquetá – Google maps e (B) Distribuição espacial de *Ae. albopictus* na Ilha de Paquetá em julho de 2015. Pontos em verde (presença) e pontos em preto (ausência).

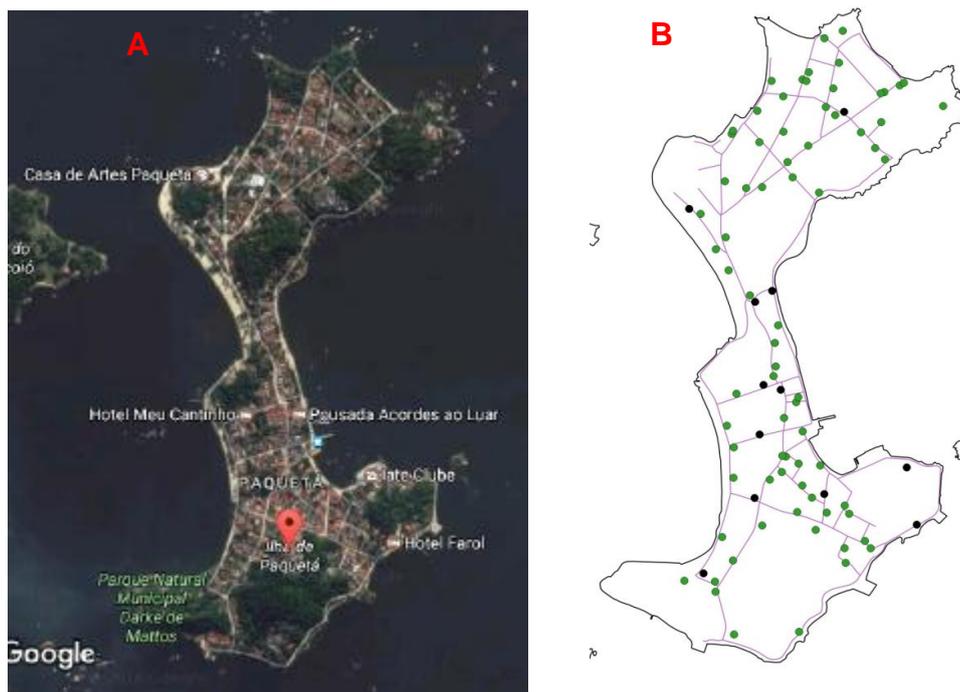


Figura 4.2-4: Distribuição espacial de *Ae. albopictus* em pontos e mapa via satélite da Ilha de Paquetá: (A) mapa via satélite da Ilha de Paquetá – Google maps e (B) Distribuição espacial de *Ae. albopictus* na Ilha de Paquetá em novembro de 2015. Pontos em verde (presença) e pontos em preto (ausência).

4.3 Avaliação do status de susceptibilidade/ resistência de *Ae. albopictus* da Ilha de Paquetá.

4.3.1 Susceptibilidade/ resistência à temephos em período de alta e de baixa densidade do vetor.

A partir dos ensaios de dose-resposta com o organofosforado temephos foram obtidas as concentrações letais (CL_{50} e CL_{95}), razão de resistência (RR_{50} e RR_{95}) e o slope para larvas de *Ae. albopictus* de Paquetá, em períodos de alta e baixa densidade do vetor, conforme mostrado na Tabela 4.3.1-1.

Tabela 4.3.1-1: Concentração letal (mg/L) e razão de resistência entre *Ae. albopictus* da Ilha de Paquetá (RJ, Brasil) em período de alta e de baixa densidade e a linhagem Rockefeller, utilizando temephos.

Linhagem/População	Geração	CL ₅₀	CL ₉₅	RR ₅₀	RR ₉₅	Slope
Rockefeller		0,006	0,011	1,0	1,0	6,0
<i>Ae. albopictus</i> (AD)	F1	0,009	0,014	1,5	1,2	8,5
<i>Ae. albopictus</i> (BD)	F1	0,011	0,019	2,0	1,7	7,6

**Ae. albopictus* (AD) = *Ae. albopictus* de período de alta densidade do vetor.

* *Ae. albopictus* (BD) = *Ae. albopictus* de período de baixa densidade do vetor.

*CL= concentração/dose letal.

*RR= razão de resistência.

A CL₅₀ para larvas Rockefeller foi de 0,006mg/L e a CL₉₅ foi de 0,011 mg/L com o inseticida temephos (tabela 4.3.1-1).

A avaliação de larvas de *Ae. albopictus* foi realizada para dois períodos: de chuvas que chamamos de Alta Densidade (AD) e para o período de seca que chamamos de Baixa Densidade (BD), no período AD as CL₅₀ e CL₉₅ foram de 0,009 mg/L e 0,014mg/L, respectivamente. Quando os resultados foram divididos pelas mesmas CL₅₀ e CL₉₅ da linhagem de referência Rockefeller, obtivemos Razão de Resistência de 1,5 para (RR₅₀) e 1,2 para (RR₉₅), sugerindo que não foi detectada resistência para a população de *Ae. albopictus* (AD) quando comparado com a linhagem de referência Rockefeller.

Para as larvas de *Ae. albopictus* (BD) as CL₅₀ e CL₉₅ foram de 0,011 mg/L e 0,019mg/L, respectivamente. Quando os resultados foram divididos pelas mesmas CL₅₀ e CL₉₅ da linhagem de referência Rockefeller, obtivemos Razão de Resistência de 2,0 para (RR₅₀) e 1,7 (RR₉₅), sugerindo que não foi detectada resistência para a população de *Ae. albopictus* (BD) quando comparado com a linhagem de referência Rockefeller. Isso significa que para se obter 50% de mortalidade das larvas de *Ae. albopictus* (BD), em um bioensaio, foi necessário uma dose 2,0 vezes maior que a usada para a linhagem referência e que para se obter 95% de mortalidade das larvas de *Ae. albopictus* (BD), em um bioensaio, foi necessário uma dose 1,7 vezes maior que a da linhagem referência. Os resultados sugerem que não foi detectada resistência para a população de *Ae. albopictus* nos períodos avaliados, embora

tenham demonstrado maior tolerância ao temephos quando comparadas com a linhagem referencia Rockefeller.

A tabela também mostra que o slope, foi maior para *Ae. albopictus* (BD) (7,6) e (AD) (=8,5), que para a linhagem Rockefeller (6,0). Isto indica que a população de *Ae. albopictus* da Ilha de Paquetá se mostrou mais homogênea que a linhagem referência Rockefeller independente do período da coleta.

A mortalidade relacionada às diferentes concentrações de inseticida é representada na figura 4.3.1-1, na qual pode-se observar que a mortalidade para *Ae. albopictus* de ambos os períodos (AD e BD) se inicia em concentração maior que para a linhagem Rockefeller. A concentração necessária para a maior mortalidade também é maior para *Ae. albopictus* (de ambos os períodos) que para Rockefeller. O desvio das curvas de *Ae. albopictus* para a direita indicam maior tolerância ao inseticida em relação à Rockefeller. Da mesma forma, o desvio de *Ae. albopictus* (BD) para a direita em relação a *Ae. albopictus*(AD), mostra maior tolerância desta população ao inseticida temephos.

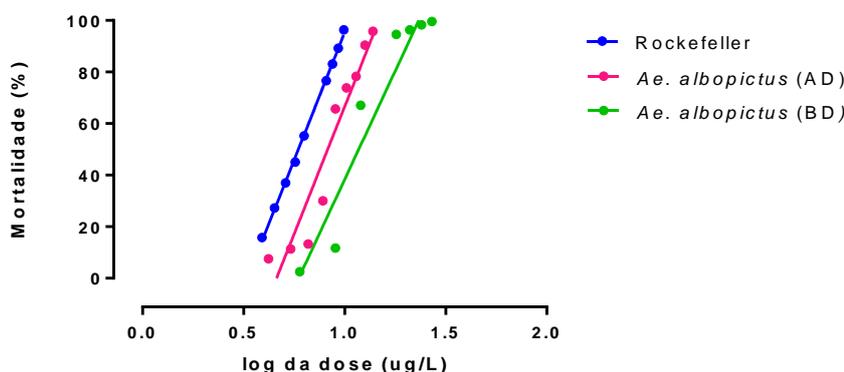


Figura 4.3.1-1: Perfil da mortalidade em ensaios biológicos do tipo dose-resposta com temephos: linhagem Rockefeller (azul), *Ae. albopictus* (AD) (rosa) e *Ae. albopictus* (BD) (verde) da Ilha de Paquetá (RJ, Brasil).

4.3.2 Susceptibilidade/ resistência à deltametrina em período de alta e de baixa densidade do vetor.

A partir dos ensaios de dose-resposta com o piretroide deltametrina foram obtidas as concentrações letais (CL_{50} e CL_{95}), razão de resistência (RR_{50} e RR_{95}) e o

slope para mosquitos *Ae. albopictus* de Paquetá, em períodos de alta e baixa densidade do vetor, conforme mostrado na Tabela 4.3.2-1.

Tabela 4.3.2-1: Concentração letal (mg/m^2) e razão de resistência entre *Ae. albopictus* da Ilha de Paquetá (RJ, Brasil) em período de alta e de baixa densidade e a linhagem Rockefeller, utilizando deltametrina.

População/Linhagem	Geração	CL ₅₀	CL ₉₅	RR ₅₀	RR ₉₅	Slope
Rockefeller		0,929	1,850	1,0	1,0	5,5
<i>Ae. albopictus</i> (AD)	F2	1,968	5,628	2,1	3,0	3,6
<i>Ae. albopictus</i> (BD)	F1	1,246	4,293	1,3	2,3	3,1

**Ae. albopictus* (AD) = *Ae. Albopictus* de período de alta densidade do vetor.

* *Ae. albopictus* (BD) = *Ae. albopictus* de período de baixa densidade do vetor.

*CL= concentração/dose letal.

*RR= razão de resistência.

A CL₅₀ para mosquitos Rockefeller foi de 0,929 mg/m^2 e a CL₉₅ foi de 1,850 mg/m^2 com o inseticida deltametrina (tabela 4.3.2-1).

A avaliação de mosquitos *Ae. albopictus* utilizando deltametrina também foi realizada para dois períodos (AD e BD). No período AD as concentrações letais CL₅₀ e CL₉₅ foram de 1,968 mg/m^2 e 5,628 mg/m^2 , respectivamente. Quando os resultados foram divididos pelas mesmas CL₅₀ e CL₉₅ da linhagem de referência Rockefeller, obtivemos Razão de Resistência de 2,1 para (RR₅₀) e 3,0 para (RR₉₅) sugerindo que não foi detectada resistência para a população de *Ae. albopictus* (AD) quando comparado com a linhagem de referencia Rockefeller.

Para os mosquitos *Ae. albopictus* (BD) as CL₅₀ e CL₉₅ foram de 1,246 mg/m^2 e 4,293 mg/m^2 , respectivamente. Quando os resultados foram divididos pelas mesmas CL₅₀ e CL₉₅ da linhagem de referência Rockefeller, obtivemos Razão de Resistência de 1,3 para (RR₅₀) e 2,3 (RR₉₅), sugerindo que não foi detectado resistência para a população de *Ae. albopictus* (BD) quando comparado com a linhagem de referência Rockefeller. Isso significa que para se obter 50% de mortalidade de *Ae. albopictus*(BD), em um bioensaio, foi necessário uma dose 1,3 vezes maior que a usada para a linhagem referência e que para se obter 95% de mortalidade de *Ae. albopictus* (BD), em um bioensaio, foi necessário uma dose 2,3 vezes maior que a da linhagem referência. Os resultados sugerem que não foi detectada resistência

para a população de *Ae. albopictus* nos períodos avaliados, embora tenham demonstrado maior tolerância à deltametrina quando comparadas com a linhagem de referência Rockefeller.

A tabela também mostra que o slope, foi menor para *Ae. albopictus* (BD) (3,1) e (AD) (3,6), que para a linhagem Rockefeller (5,5). Isto indica que a população de *Ae. albopictus* da Ilha de Paquetá se mostrou menos homogênea que a linhagem referência Rockefeller independente do período da coleta.

A mortalidade relacionada às diferentes concentrações de inseticida é representada na figura 4.3.2-1, na qual pode-se observar que a mortalidade para *Ae. albopictus* (AD) se inicia em concentração maior que para a linhagem Rockefeller e que a mortalidade para Rockefeller se inicia em concentração maior que para *Ae. albopictus* (BD). A concentração necessária para a maior mortalidade é maior para *Ae. albopictus* (de ambos os períodos) que para Rockefeller. O desvio da curva de *Ae. albopictus* (AD) para a direita indica maior tolerância ao inseticida em relação à Rockefeller. O perfil da curva de *Ae. albopictus* (BD), se iniciando antes da curva de Rockefeller e terminando quase junto a *Ae. albopictus* (AD), mostra que esta população é mais heterogênea que Rockefeller e *Ae. albopictus* (AD), necessitando um maior faixa de concentrações para atingir 95% de mortalidade, diferente da população (AD).

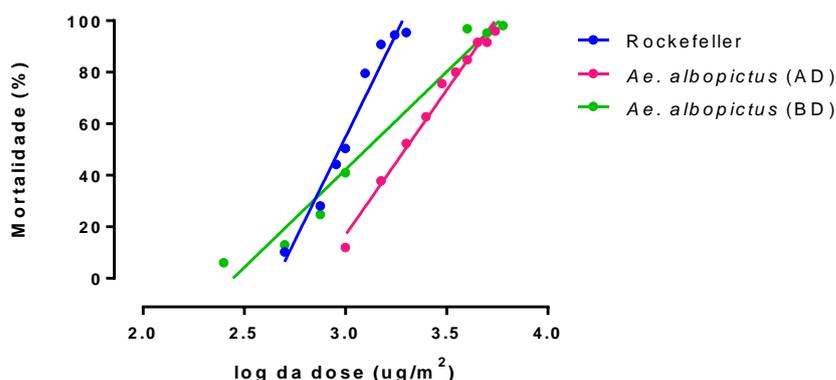


Figura 4.3.2-1: Perfil da mortalidade em ensaios biológicos do tipo dose-resposta com deltametrina: linhagem Rockefeller (azul), *Ae. albopictus*(AD) (rosa) e *Ae. albopictus*(BD) (verde) da Ilha de Paquetá (RJ, Brasil).

4.3.3 Susceptibilidade/ resistência à malathion em período de alta e de baixa densidade do vetor.

A partir dos ensaios de dose-resposta com o organofosforado malathion foram obtidas as concentrações letais (CL_{50} e CL_{95}), razão de resistência (RR_{50} e RR_{95}) e o slope para mosquitos *Ae. albopictus* de Paquetá, em períodos de alta e baixa densidade do vetor, conforme mostrado na Tabela 4.3.3-1.

Tabela 4.3.3-1: Concentração letal (mg/m^2) e razão de resistência entre *Ae. albopictus* da Ilha de Paquetá (RJ, Brasil) em período de alta e de baixa densidade e a linhagem Rockefeller, utilizando malathion.

População/Linhagem	Geração	CL_{50}	CL_{95}	RR_{50}	RR_{95}	Slope
Rockefeller		102,460	175,506	1,0	1,0	7,0
<i>Ae. albopictus</i> (AD)	F2	65,461	212,515	0,6	1,2	3,2
<i>Ae. albopictus</i> (BD)	F1	100,311	248,971	1,0	1,4	4,2

**Ae. albopictus* (AD) = *Ae. albopictus* de período de alta densidade do vetor.

* *Ae. albopictus* (BD) = *Ae. albopictus* de período de baixa densidade do vetor.

* CL = concentração/dose letal.

* RR = razão de resistência.

A CL_{50} para Rockefeller foi de 102,460 mg/m^2 e a CL_{95} foi de 175,506 mg/m^2 com o inseticida malathion (tabela 4.3.3-1).

A avaliação de mosquitos *Ae. albopictus* utilizando malathion também foi realizada para os dois períodos: Alta Densidade (AD) e Baixa Densidade (BD). No período AD as CL_{50} e CL_{95} foram de 65,461 mg/m^2 e 212,515 mg/m^2 , respectivamente. Quando os resultados foram divididos pelas mesmas CL_{50} e CL_{95} da linhagem de referência Rockefeller, obtivemos Razão de Resistência de 0,6 para (RR_{50}) e 1,2 para (RR_{95}), sugerindo que não foi detectada resistência para a população de *Ae. albopictus* (AD) quando comparado com a linhagem de referência Rockefeller.

Para os mosquitos *Ae. albopictus* (BD) as CL_{50} e CL_{95} foram de 100,311 mg/m^2 e 248,971 mg/m^2 , respectivamente. Quando os resultados foram divididos pelas mesmas CL_{50} e CL_{95} da linhagem de referência Rockefeller, obtivemos Razão de Resistência de 1,0 para (RR_{50}) e 1,4 (RR_{95}), sugerindo que não foi detectada

resistência para a população de *Ae. albopictus* (BD) quando comparado com a linhagem de referência Rockefeller. Isso significa que para se obter 50% de mortalidade de *Ae. albopictus* (BD), em um bioensaio, foi necessário uma concentração igual a usada para a linhagem referência e que para se obter 95% de mortalidade de *Ae. albopictus* (BD), em um bioensaio, foi necessário uma concentração 1,4 vezes maior que a da linhagem referência. Os resultados sugerem que não foi detectado resistência para a população de *Ae. albopictus* nos períodos avaliados, embora *Ae. albopictus* (BD) tenha demonstrado maior tolerância a malathion quando comparado com a linhagem referência Rockefeller para a CL_{95} .

A tabela também mostra que o slope, foi menor para *Ae. albopictus* (BD) (=4,2) e (AD) (=3,2), que para a linhagem Rockefeller (=7,0). Isto indica que a população de *Ae. albopictus* da Ilha de Paquetá se mostrou menos heterogênea que a linhagem referência Rockefeller independente do período da coleta.

A mortalidade relacionada às diferentes concentrações de inseticida é representada na figura 4.3.3-1, na qual pode-se observar que a mortalidade para *Ae. albopictus* (BD) e (AD) se inicia em concentração menor que para a linhagem Rockefeller. A concentração necessária para a maior mortalidade é quase a mesma para *Ae. albopictus* (BD) e (AD) e para Rockefeller. O desvio da curva de *Ae. albopictus*(AD) para a esquerda indica menor tolerância ao inseticida em relação a Rockefeller e a *Ae. albopictus* (BD).

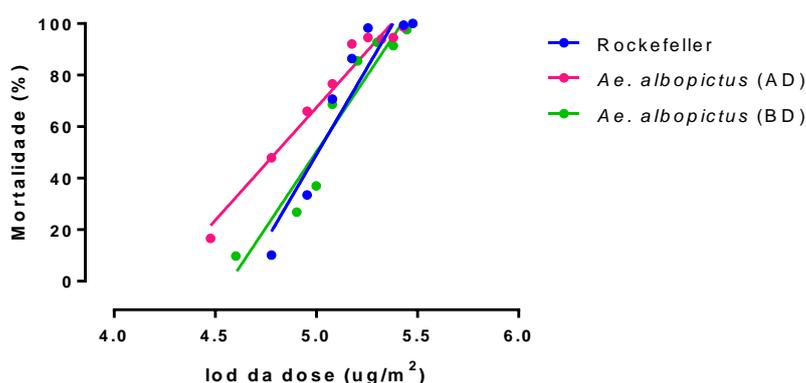


Figura 4.3.3-1: Perfil da mortalidade em ensaios biológicos do tipo dose-resposta com malathion: linhagem Rockefeller (azul), *Ae. albopictus* (AD) (rosa) e *Ae. albopictus* (BD) (verde) da Ilha de Paquetá (RJ, Brasil).

4.4 Frequência genotípica e alélica da mutação 1534 na população de *Ae. albopictus* na Ilha de Paquetá.

No total de 90 amostras genotipadas, apenas 40 forneceram resultados, sendo todas classificadas como homozigotas Phe/Phe, ou seja, 100% do alelo selvagem 1534 Phe⁺ (Figura 4.4-1). Vale notar ainda, que além de poucas amostras terem sido amplificadas e detectadas, a intensidade destas foi bem abaixo dos controles positivos. Estes resultados sugerem que o ensaio utilizado não deve ser sensível e/ou específico para a população de *Ae. albopictus* aqui avaliada.

Allelic Discrimination Plot

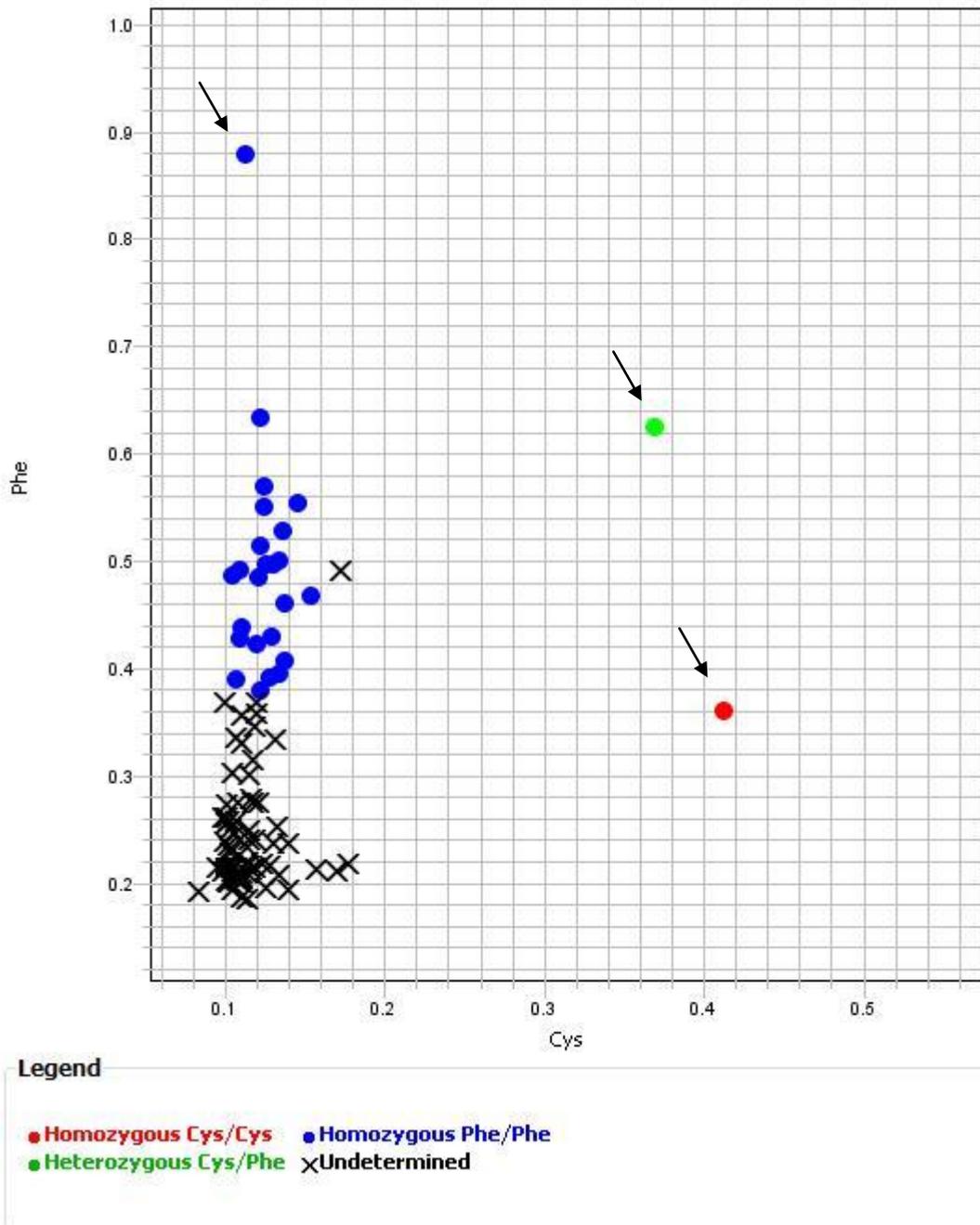


Figura 4.4-1: Genotipagem para o sítio 1534 no Na_v de *Ae. albopictus* da Ilha de Paquetá. Ensaio de PCR em tempo real, método TaqMan, onde cada ponto representa a intensidade de sinal para cada alelo (Phe^+ ou Cys^{kdr}). Homozigoto selvagem (azul), homozigoto mutante (vermelho), heterozigoto (verde) e indeterminado (preto). Os controles positivos estão indicados com uma seta.

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostraram que o número de ovos de *Aedes* spp., o IDO e o IMO na Ilha de Paquetá no período de um ano (2015/2016) foram maiores no período chuvoso (novembro de 2015, janeiro e março de 2016) e menores no período de seca (maio, julho e setembro de 2015), embora o IPO não tenha acompanhado essa tendência, pois não variou muito através desses dois diferentes períodos do ano. Os índices de ovos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* não foram afetados pela temperatura e pela umidade. Em estudo semelhante, Zeidler e col. (2008) mostraram que o número de ovos de *Ae. aegypti* coletados esteve relacionado ao índice de chuvas em um bairro da cidade de Boa Vista (RR). Costa e col. (2008) também puderam constatar que, tanto a positividade de ovitrampas quanto a média de ovos por coleta, foram maiores no período chuvoso e menores no período de seca, na zona urbana de Uberlândia (MG). Semelhantemente, Miyazaki e col. (2009) puderam verificar que apenas o índice de chuvas, entre os fatores abióticos estudados, influenciou no número de ovos coletados em um campus universitário, em Cuiabá (MT). E um estudo de revisão feito por Viana & Ignotti (2013) mostrou que independente da região brasileira estudada, quanto maior a pluviosidade, maior os índices do vetor da dengue. Desta forma, estes estudos corroboram com os resultados obtidos neste trabalho.

Durante um ano de coleta na Ilha de Paquetá, foram obtidos espécimes de *Ae. albopictus* com diferentes frequências no decorrer dos meses, com novembro de 2015, janeiro e março de 2016 (meses de altos índices de chuvas) apresentando as maiores frequências. Em concordância, foi visto no estudo realizado com instalação de ovitrampas em zona de transição entre área urbana e florestal no Rio de Janeiro, que os picos na ocorrência de *Ae. albopictus* (e *Ae. aegypti*) foram durante a estação chuvosa, que durou de setembro a fevereiro em 2002 e de agosto a março em 2003 (Honório et al. 2009).

Quanto à presença do vetor nos pontos de coleta, no período de seca foram obtidos os menores números de pontos de ocorrência e no período de chuvas foram obtidos os maiores número de pontos de ocorrência. Apesar disso,

foi verificado que o perfil de distribuição de *Ae. albopictus* se manteve por toda a extensão da Ilha independente dos períodos. Da mesma forma, o trabalho de Glaser & Gomes (2002) investigando, entre outros fatores, a influência do índice pluviométrico de municípios do estado de São Paulo no perfil de ocorrência de *Ae. albopictus* por dez anos (1985-1995), mostrou que o índice de chuvas não exerceu influência significativa nos padrões de expansão geográfica de *Ae. albopictus*, que se estabeleceu em 47,5% dos municípios estudados.

Há tempos *Ae. albopictus* é descrito como um mosquito mais facilmente encontrado em ambiente silvestre embora adaptado a domicílios tendo também como criadouros recipientes peridomiciliares (Consoli & Oliveira 1994, FUNASA 2001, Braga & Vale 2007_b). Porém, estudos indicam a maior concentração de *Ae. albopictus* em áreas menos urbanizadas. O trabalho de Lima-Câmara e col. (2006) nas cidade de Nova Iguaçu e Rio de Janeiro nos anos de 2002 a 2004, mostrou que *Ae. albopictus* foi pouco frequente em áreas urbanas e suburbanas e altamente frequente em área rural, além disso foi mais frequente nos peridomicílios do que nos domicílios, mostrando sua afinidade por locais mais associados a vegetação e à escassez de seres humanos. De igual modo, o estudo de Honório et al (2009) sobre a distribuição espacial do *Ae. aegyptie* *Ae. albopictus* em zona de transição no Rio de Janeiro, mostrou que *Ae. albopictus* é mais encontrado em áreas com características florestais. No presente trabalho, porém, observou-se que este mosquito esteve presente tanto em pontos de maior cobertura vegetal quanto em pontos de menor cobertura vegetal da Ilha de Paquetá durante o ano todo (figuras 4.2-3 e 4.2-4), o que confirma sua adaptação a ambientes urbanos mas, também, sua permanência em ambientes silvestres.

O *Ae. albopictus* tem ocorrência em diversos países da Ásia, América, África, Europa e Oceania (Kraemer e col. 2015). Isto está relacionado ao seu grande potencial invasivo e a sua facilidade de adaptação a diferentes ambientes (Ngoagouni e col. 2015). Somado a isso, tem-se o fato de ser potencial vetor de cerca de 20 arbovírus (Paupy e col. 2009) e de atuar de forma secundária ou mesmo principal na transmissão de DENV e CHIKV no exterior do Brasil (Gratz 2004, Pagès e col. 2009).

Desta forma, a presença do *Ae. albopictus* no Brasil e na cidade do Rio de Janeiro somando-se à sua presença tanto em áreas urbanas quanto em áreas

silvestres, como verificado neste estudo, é um importante fator para que este mosquito seja incluído nas ações de controle. Apesar disso, são raros os trabalhos publicados envolvendo controle e monitoramento de resistência de *Ae. albopictus* a inseticidas.

Este foi o primeiro trabalho abordando o perfil de resistência a inseticidas, especificamente, de uma população de *Ae. albopictus* na cidade do Rio de Janeiro.

Neste estudo, o critério adotado para avaliação do perfil de resistência de *Ae. albopictus* foi o recomendado pelo Programa Nacional de Controle de Dengue, objetivando o uso racional de pesticidas, já considerando resistentes populações com $RR_{95} > 3$ para que o processo de substituição de inseticida seja iniciado e haja a preservação dos inseticidas nas ações de controle (Brasil, 2006 apud Bellinato e col. 2016).

Os bioensaios com o larvicida temephos mostraram que os *Ae. albopictus* da Ilha de Paquetá coletados no período de alta e de baixa densidade (AD e BD) foram suscetíveis a este larvicida pois apresentaram $RR_{95} < 3$ (=1,2 e 1,7, respectivamente). Da mesma forma, estudo de Prophiro e col. (2011) com populações deste mosquito em municípios do Paraná e Santa Catarina mostraram em todas as populações que *Ae. albopictus* foi suscetível a temephos, apresentando RR_{95} de 1,97 à 2,58. Estes resultados correspondem ao fato de que o temephos, apesar de por muito tempo ter sido o único organofosforado permitido em água potável utilizado no Brasil (Braga & Vale 2007_b, WHO 2013), no ano 2000 começou a ser substituído por outros larvicidas devido à detecção de populações de *Ae. aegypti* resistentes em diversos municípios do país (Braga & Vale 2007_c). Apesar disso, em trabalho de revisão sobre resistência de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* a inseticidas, realizado por Vontas e col. (2012), foi visto que em diferentes regiões do planeta as concentrações letais com temephos para a mortalidade de 50% de *Ae. albopictus* são maiores em locais onde esse larvicida tem sido usado por muitos anos. Isso explica o fato de, apesar de que suscetível, este culicídae ter apresentado maior tolerância ao temephos que a linhagem referência, como visto na figura 4.3.1-1. As concentrações letais (CL_{50} e CL_{95}) obtidas neste estudo para os *Ae. albopictus* da Ilha de Paquetá

confirmaram isto, tendo sido maiores para *Ae. albopictus*(BD) e (AD) que para Rockefeller, como mostrado na tabela 4.3.1-1.

Os bioensaios com deltametrina mostraram que os *Ae. albopictus* da Ilha de Paquetá (AD e BD) foram suscetíveis a este piretroide pois apresentaram $RR_{95} = 3$ e $RR_{95} < 3$ (=2,3), respectivamente. Em concordância, o trabalho de revisão de Vontas e col. (2012) relata que populações de *Ae. albopictus* de diferentes locais do mundo (Índia, Malásia, Tailândia, Camarões, Grécia e Itália) permaneceram suscetíveis a piretroides mesmo depois de anos. Os piretroides foram utilizados em escala nacional no Brasil desde o ano 2000 e em cerca de 2 anos já se havia detectado indícios de resistência em populações de *Ae. aegypti* (Valle, Belinato & Martins 2015). Atualmente a resistência de *Ae. aegypti* a essa classe de adulticida está comprovadamente instalada no Brasil (Linss e col. 2014). Apesar de ser uma classe de inseticida comercializada para uso doméstico até os dias de hoje, desde o ano de 2009 tem sido substituído pelo adulticida malathion para ações de controle do PNCD (Valle, Belinato & Martins 2015). Este contexto somando-se ao fato de *Ae. albopictus* ser um culicídeo silvestre e, frequentemente peridomiciliar, sugere a susceptibilidade detectada para deltametrina em *Ae. albopictus* da Ilha de Paquetá (AD e BD). Além disso, também justifica a notória tolerância de *Ae. albopictus* ao piretroide deltametrina quando comparado à linhagem suscetível Rockefeller (como visto na tabela 4.3.2-1). Pode-se perceber no presente estudo que, assim como a resistência, as concentrações letais também foram maiores para os de período de alta densidade ($CL_{50} = 1,97 \text{ mg/m}^2$ e $CL_{95} = 5,63 \text{ mg/m}^2$) e menores para os de período de baixa densidade ($CL_{50} = 1,25 \text{ mg/m}^2$ e $CL_{95} = 4,29 \text{ mg/m}^2$) em *Ae. albopictus* da Ilha de Paquetá. Em consonância, o trabalho de Duque e col. (2008) avaliando a resistência de *Ae. aegypti* à temephos no estado do Paraná, sugere que em condições de menor temperatura ambiente, e conseqüente baixa densidade populacional de culicídeos, há redução do controle químico e, desta forma, as concentrações letais e razões de resistência são menores.

Os bioensaios com malathion mostraram que os *Ae. albopictus* da Ilha de Paquetá de período de alta e de baixa densidade foram suscetíveis pois apresentaram $RR_{95} < 3$ (=1,2 e 1,4, respectivamente). Sabe-se que o malathion foi um dos organofosforados utilizados no programa de controle de dengue no Brasil há cerca de 20 anos atrás (Braga & Vale 2007_c) e que voltou a ser utilizado substituindo

os piretroides em 2009 (Valle, Belinato & Martins 2015, Linss e col. 2014). Desta forma, uma boa justificativa é o que foi exposto no trabalho de Vontas e col. (2012), o qual relacionou o fato de populações de *Ae. albopictus* terem se mostrado suscetíveis a malathion por sua característica exofílica, que o leva a uma menor exposição ao adulticida. Tanto as razões de resistência quanto as concentrações letais deste culicídeo foram menores para os de período de alta densidade ($CL_{50} = 65,461 \text{ mg/m}^2$ e $CL_{95} = 212,515 \text{ mg/m}^2$) e maiores para os de período de baixa densidade ($CL_{50} = 100,311 \text{ mg/m}^2$ e $CL_{95} = 248,971 \text{ mg/m}^2$). Tal como para os resultados obtidos com temephos, são necessários estudos complementares para a compreensão deste fato.

Brito e col. (2013) identificaram altas frequências de mutações *kdr* em *Ae. aegypti* de 26 localidades do Estado do Rio de Janeiro, com a menor delas observada na Ilha de Paquetá. Em recente trabalho, já não houve detecção de alelos selvagens no sítio 1534 do Na_v de *Ae. aegypti* de Paquetá (Paula Borges, comunicação pessoal).

Com relação a possíveis alterações no gene alvo dos piretroides, foi realizado o mesmo ensaio de genotipagem do sítio 1534 do Na_v que utilizamos para *Ae. aegypti*, uma vez que recentemente pôde-se verificar que as regiões de anelamento dos *primers* e sondas deste ensaio são idênticas à sequência de populações brasileiras de *Ae. albopictus* (Obano-Aguirre et al, no prelo). Contudo, os resultados aqui encontrados mostraram baixa sensibilidade para a genotipagem de nossas amostras, comparada aos controles positivos provenientes de *Ae. aegypti*. Uma vez que as concentrações e a integridade do DNA de nossas amostras eram semelhantes aos controles positivos, sugere-se que ou a eficiência de amplificação foi inferior e/ou as sondas não seriam específicas para as nossas amostras. Em ambos os casos isto ocorreu, possivelmente, por baixa complementariedade entre as sequências dos *primers* e/ou sondas com as amostras de Paquetá. Será necessário, portanto, sequenciar a região IIS6 do Na_v (onde se encontra a posição 1534) de amostras desta localidade a fim de determinarmos um melhor ensaio para esta espécie.

Diferentes mutações relacionadas à resistência de *Aedes albopictus* a piretroide têm sido detectadas em populações deste mosquito em diferentes locais do mundo: a mutação F1534C (procurada neste estudo) foi encontrada em populações de Singapura (Kasai et al. 2011) e do Brasil (Aguirre-Obano et al, no prelo), F1534L na da Malásia e dos Estados Unidos, F1534S nas do sul da China e Flórida e I1532T na de

Roma (Xu et al 2016). Isto mostra que há uma diversidade no sítio 1534 do Na_v em *Ae. albopictus*, de forma que se reforça a necessidade de se conhecer a diversidade genética da população local antes de se aplicar ensaios diagnósticos previamente elaborados para outras populações.

6 PERSPECTIVAS

Para a publicação dos resultados desta dissertação, serão feitas as análises estatísticas para avaliar a correlação entre dos dados dos índices de ovitrampas, frequência encontrada de *Ae. albopictus* e as condições meteorológicas da área avaliada. Os dados obtidos relativos ao perfil de resistência também serão analisados estatisticamente.

Será sequenciada a região IIS6 do Na_v para uma nova análise molecular e determinação da frequência da mutação *kdr* em *Ae. albopictus* da Ilha de Paquetá.

7 CONCLUSÕES

Ae. albopictus ocorre com maior frequência nos meses com maior índice pluviométrico.

Ae. albopictus está distribuído por toda a Ilha tanto no período de chuvas quanto no período de seca, inclusive em pontos de menor cobertura vegetal, mostrando sua adaptação a áreas menos florestadas.

Foi verificada susceptibilidade aos inseticidas temephos, deltametrina e malathion.

Não foram detectados alelos referentes à mutação *kdr* na população de *Ae. albopictus* da Ilha de Paquetá.

Estudos como este são pertinentes em outras localidades com a presença do *Ae. albopictus*, grande número de casos de dengue, Zika e chikungunya e, portanto, um controle químico intensificado.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander N, Balmaseda A, Coelho IC, Dimaano E, Hien TT, Hung NT, Jänisch T, Kroeger A, Lum LC, Martinez E, Siqueira JB, Thuy TT, Villalobos I, Villegas E, Wills B. Multicentre prospective study on dengue classification in four South-East Asian and three Latin American countries. *Trop Med & International Health*. 2011; 16: 936-948.

Basu R, Tumban E. Zika Virus on a Spreading Spree: what we now know that was unknown in the 1950's. 2016;13:165.

Bellinato D F, Viana-Medeiros P F, Araújo S C, Martins A J, Lima J B P, Valle D. Resistance Status to the Insecticides Temephos, Deltamethrin, and Diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* Populations. 2016. BioMed Research International.

Bhatt, S, Samir Bhatt, Peter W. Gething, Oliver J. Brady, Jane P. Messina, Andrew W. Farlow, Catherine L. Moyes, John M. Drake, John S. Brownstein, Anne G. Hoen, Osman Sankoh, Monica F. Myers, Dylan B. George, Thomas Jaenisch, G. R. William Wint, Cameron P. Simmons, Thomas W. Scott, Jeremy J. Farrar, Simon I. Hay. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013; 496: 504-507. [Internet]. [acesso 22/11/16]. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Oliver_Brady/publication/236127994_The_global_distribution_and_burden_of_Dengue/links/543648690cf2dc341db2ea16.pdf?origin=publication_list.

Braga I A, Valle D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 2007_a;16(2): 113.

Braga I A, Valle D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 2007_b;16(4): 279-293.

Braga I A, Valle D. *Aedes aegypti*: Vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 2007_c;16(4): 295-302.

Brito L P, Linss J G B, Lima-Camara T N, Belinato T A, Lima J B P, Valle D, Martins A J. Assessing the Effects of *Aedes aegypti kdr* Mutations on Pyrethroid Resistance and Its Fitness Cost. *PloSOne*. 2013; e60.878.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde (Brasil). Reunião Técnica para Discutir Status de Resistência de *Aedes aegypti*. 2006. Rio de Janeiro, Brazil.

Carvalho RG, Lourenço-de-Oliveira R, Braga I A. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014; 109(6): 787-796.

Castro M G, Nogueira R M R, Schatzmayr H G, Miagostovich M P, Lourenço-de-Oliveira R. Dengue Virus Detection by Using Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction in Saliva and Progeny of Experimentally Infected *Aedes albopictus* from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99(8): 809-814.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Entomol & Ecology. 2016_a. [Internet]. [acesso 2016 novembro 24]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology>

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Chikungunya Virus Geografic Distribution [Internet]. 2016_b. [acesso 2016 novembro 25]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/chikungunya/geo>.

Chen H, Li K, Wang X, Yang X, Lin Y, Cai F, Zhong W, Lin C, Lin Z, Ma Y. First identification of kdr allele F1534S in VGSC gene and its association with resistance to pyrethroid insecticides in *Aedes albopictus* populations from Haikou City, Hainan Island, China. Infectious Diseases of Poverty. 2016; 5:31.

Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 1994. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 228 p.

Costa FS, Silva JJ, Souza CM, Mendes J. Dinâmica populacional de *Aedes aegypti* (L) em área urbana de alta incidência de dengue. Rev Soc Bras Med Trop. 2008; 41(3).

Cunha & Martínez. Manejo clínico do paciente com dengue. In: Valle D, Dengue teorias e práticas. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2015; 240pp.

Cunha RV, Dias M, Nogueira RMR, Chagas N, Miagostovich MP, Scatzmayr HG. Secondary dengue infection in school children in a dengue endemic área in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Rev Inst Med Trop de São Paulo. 1995; 37:517-521. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v37n6/a08v37n6.pdf>.

Davies TGE, Field LM; Usherwood PNR; Williamson MS. Critical Review DDT, Pyrethrins, Pyrethroids and Insect Sodium Channels. Life. 2007; 59(3):151-162.

Dietz VJ, Gubler DJ, Rigau-Pérez JG, Pinheiro F, Schatzmayr HG, Bailey R, Gunn RA. Epidemic dengue 1 in Brazil, 1986: evaluation of a clinically based dengue surveillance system. *Am Journal of Epidem.* 1990; 131:693-701.

Duque JEL. Descrição e análise de fatores epidemiológicos, vetoriais e do controle da dengue no estado do Paraná, Brasil. Tese de doutorado. Curitiba: Paraná. Universidade Federal do Paraná; 2008. 150p. Disponível em: acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/13909/TeseJonny-Duque2008.pdf

Falcão M, Bandeira AC, Luz K, Chebabo A, Brígido H, Lobo I, Timerman A, Angerami R, Cunha CA, Bacha H, Alves J, Barbosa AN, Teixeira R, Wessmann L, Oliveira PR, Cyrillo MA, Cimerman S. *Soc Bra Infectologia.* 2016. Guia de Manejo da Infecção pelo vírus zika.

Ferrari JA. Insecticide resistance. In: *The Biology of Disease Vectors.* Colorado: University Press of Colorado. 1996.

Ffrench-Constant RH, Pittendrigh B, Vaughan A, Anthony N. Why there so few resistance-associated mutation target genes? *Philosophical Transactions of the Royal Society London.* 1998; 353:1685-1693.

Fiocruz. IOC. Mosquitos *Aedes aegypti* e *albopictus* são diferentes na competência para transmitir Zika. [Internet]. 2016. [Acesso 2017 janeiro 23]. Disponível em:

<https://portal.fiocruz.br/pt-br/content/aedes-aegypti-e-aedes-albopictus-das-americas-mostram-diferencas-na-susceptibilidade-ao>

Fiocruz. IOC. Vetor da Dengue na Ásia, *A. albopictus* é alvo de estudos. [Internet]. 2008. [Acesso 2017 janeiro 23]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inford=576&sid=32>

Forattini OP. *Culicidologia Médica.* Vol. 2. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002. 464-472pp.

Forattini OP. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. *Rev Saúde Pub.* 1986; 20(3): 244-5

Fundação Nacional de Saúde Funasa (FUNASA). Dengue: instruções para pessoal de combate ao vetor- Manual de normas técnicas. Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde. 2001;17-69p.

Glasser CM, Gomes AC. Clima e sobreposição da distribuição de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* na infestação do Estado de São Paulo. Rev Saúde Pública 2002;36(2):166-72.

Gomes AC. Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* em programa de vigilância entomológica. IESUS. 1998; VII(3).

Google maps – Ilha de Paquetá. [Internet]. [acesso 2017 janeiro 02]. Disponível em: <https://www.google.com.br/maps/place/Ilha+de+Paqueta>.

Governo do Estado do Rio de Janeiro. Secretaria de Estado de Obras. Obras de despoluição da Ilha de Paquetá entram em fase final. [Internet]. 2014. [acesso 2017 janeiro 03]. Disponível em: <http://www.rj.gov.br/web/seobras/exibeconteudo?article-id=2265993>.

Gratz NG. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. Med and Vet Entomol. 2004; 18: 215–227.

Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. Annual Rev Entomol. 2000; 45:371-391.

Honório NA, Castro MG, Barros FSM, Magalhães MAFM, Sabroza PC. The Spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a transition zone, Rio de Janeiro, Brazil. Cad Saúde Pub. 2009; 25(6):1203-1214.

Ilha de Paquetá. Geografia e Economia. [Internet]. [acesso 2015 agosto 26]. Disponível em: <http://www.ilhadepaqueta.com.br/geografia.htm>.

Ishak IH, Jaal Z, Ransoon H, Wondji CS. Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (*kdr*) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. Parasites & Vectors. 2015; 8:181.

Kamgang B, Marcombe S, Chandre F, Nchoutpouen E, Nwane P, Etang J, Corbel V, Paupy C. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. Parasites & Vectors. 2011; 4:79.

Kasai S, Ng LC, Lam-Phua SG, Tang CS, Itokawa K, Komagata O, Kobayashi M, Tomita T. First Detection of a Putative Knockdown Resistance Gene in Major Mosquito Vector, *Aedes albopictus*. Jpn. J Infect Dis. 2011; 64: 217-221.

Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM, Moore CG, Carvalho RG, Coelho GE, Bortel WV, Hendrickx G, Schaffner F, Elyazar I RF, TengHwa-Jen, Brady OJ, Messina JP, Pigott DM, Scott TW, Smith DL. The

global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. eLife. 2015; 4:e08347.

Lima JBP, Da-Cunha MP, Júnior RCS, Galardo AKR, Soares SS, Braga IA, Ramos RP, 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. 2003; 68(3) 329–333.

Lima-Camara TN, Honório NA, Lourenço-de-Oliveira R. Frequência e distribuição espacial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) no Rio de Janeiro, Brasil. Cad Saúde Pub. 2006; 22(10).

Linss JGB, Brito LP, Garcia GA, Araki AS, Bruno RV, Lima JBP, Valle D, Martins AJ. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. Parasites & Vectors. 2014; 7:25.

Lourenço-de-Oliveira R. Biologia e comportamento do vetor. In: Valle D. Dengue teorias e práticas. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2015_a.75-76pp.

Lourenço-de-Oliveira R. Transmissão Vetorial. In: Valle D. Dengue teorias e práticas. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2015_b.143pp.

Lu B. Funa Sinica. Insecta Vol9: Diptera, Culicidae I. Beijing: Science Press; 1997.

Luz KG, Santos GIV, Vieira RM. Febre pelo vírus zika. Epidemiol Serv Saúde, Brasília. 2015; 24(4):785-788.

Marcoris MLG, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Bracco JE. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98(5):703-708.

Martínez, E. Dengue. Estudos avançados. 2008; 22: 33-52.

Meng F, Wang Y, Feng L, Liu Q. Review on dengue prevention and control and integrated mosquito management in China. Chin J Vector Biol Control. 2015; 26(1):4-10.

Miyazaki RD, Ribeiro ALM, Pignatti MG, Júnior JHC, Pignatti M. Monitoramento do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), por meio de ovitrampas no Campus da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Estado de Mato Grosso. Rev Soc Bras Med Trop. 2009; 42(4).

Ministério da Saúde – MS (Brasil). Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2009; 160p.

Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde – MS/SVS, Secretaria de Atenção Básica. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Febre de chikungunya: manejo clínico. [Internet]. Brasília; 2015_a. [acesso 2016 dezembro 14]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/profissional-e-gestor/principal/noticias/16712-ms-lanca-guia-sobre-febre-de-chikungunya>

Ministério da Saúde - MS. Tira-dúvidas – Dengue, Chikungunya e Zika [Internet]. 2016_c. [acesso 2016 dezembro 20]. Disponível em: www.combateaedes.saude.gov.br/pt/tira-duvidas

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde - MS/SVS. Volume 46- 2015_b. Monitoramento dos casos de dengue e febre de Chikungunya até semana epidemiológica 12, 2015. Available from:

<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/197-secretaria-svs/11955-boletins-epidemiologicos-arquivos>

Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde - MS/SVS. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2015. [Internet]. 47(3); 2016_a. [acesso 2016 dezembro 14]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/197-secretaria-svs/11955-boletins-epidemiologicos-arquivos>

Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde - MS/SVS. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 37. [Internet]. 47(34); 2016_b. [acesso 2016 dezembro 14]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/197-secretaria-svs/11955-boletins-epidemiologicos-arquivos>

Ngoagouni C, Kamgang B, Nakouné E, Paupy C, Kazanji M. Invasion of *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae) into central Africa: What Consequences for emerging diseases?. *Parasites & Vectors*. 2015; 8:191.

OMS. Organização Mundial de Saúde. 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. WHO/VBC/81.807. 1981. World Health Organization.

OMS - Organização Mundial de Saúde 1998. Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vectors, Bio-efficacy and Persistence of Insecticides on Treated Surfaces. WHO/CDS/CPC/MAL/98.12.

Pagès F, Peyreffite CN, Mve MT, Jarjaval F, Brisse S, Itean I, Gravier P, Nkogue D, Grandadam M. *Aedes albopictus* Mosquito: The Main Vector of the 2007 Chikungunya Outbreak in Gabon. Plos One. 2009. 4(3): e4691.

Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. Microbes and Infection. 2009; 1177-1185.

Portal Brasil. Saúde - Primeira vacina contra a dengue tem registro aprovado. [Internet]. 2016. [acesso 2016 dezembro 20]. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2015/12/primeira-vacina-contra-a-dengue-tem-registro-aprovado>.

Prophiro JS, Silva OS, Luna JED, Piccoli CF, Kanis LA, Silva MAN. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistence and susceptibility to temephos, in municipalities with occurrence of dengue and differentiated characteristics of urbanization. Rev da Soc Bras de Med Tropical. 2011; 44(3):300-305.

Robert RI. Pesticides and Public Health: integrated methods of mosquito management. Emerg Infec Diseases. 2001; 7(1):17-23.

RupsaBasu and Ebenezer Tumban. Zika Virus on a Spreading Spree: what we now know that was unknown in the 1950's. Virology Journal. 2016; 13:165.

Sociedade Brasileira de Infectologia - SBI. Guia de manejo da infecção pelo vírus Zika [Internet]. 2016. [Acesso em 2016 dezembro 22]. Disponível em: www.infectologia.org.br/admin/zcloud/125/2016/07/guia_manejo_zika_SBI.pdf

Silverman, BW. Density Estimation for Statistics and Data Analysis. Nova York: Chapman and Hall.1986.

Superintendência de Campanhas de Saúde Pública - SUCAN. Resumo dos principais caracteres morfológicos diferenciais do *Aedes aegypti* e do *Aedes albopictus*. Brasília: 1989.

Valle D, Belinato T A, Martins A J. Controle Químico de *Aedes aegypti*, Resistência a inseticidas e alternativas. In: Valle D. Dengue teorias e práticas. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2015c.93-126pp.

Vega-Rúa A, Zouache K, Girod E, Failloux Anna-Bela, Lourenço-de-Oliveira R. High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. *Journal of Virology*. 2014; 88(11).

Viana DV, Ignotti E. The occurrence of dengue and weather changes in Brazil: A systematic review. *Rev Bras Epidemiol*. 2013; 16(2): 240-56.

Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, della Torre A, Ranson H. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2012; 104: 126–131.

Ware GW e Whitacre DM. An introduction to insecticides [Internet]. Minnesota; 2004. Disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware/htm>

World Health Organization - WHO. Doença do Vírus Zika [Internet]. 2016b. [acesso em 2017 dezembro 12]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/pt/>

World Health Organization – WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control [Internet]. Geneva; 2009. [acesso em 2016 novembro 16]. Disponível em: <http://www.who.int/rpc/guidelines/9789241547871/en/>.

World Health Organization – WHO. Dengue [Internet]. 2014. [acesso 2017 janeiro 03]. Disponível em: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_DengueTransmission_ITH_RiskMap.png?ua=1.

World Health Organization - WHO. Dengue [Internet]. 2016a. [acesso 2016 outubro 16]. Disponível em: <http://www.who.int/topics/dengue/en/>.

World Health Organization – WHO. Handbook for Clinical Management of Dengue. Geneva. 2012a.

World Health Organization – WHO. WHO recommended insecticides for space spraying against mosquitoes. [Internet]. 2012b. [acesso 2016 dezembro 20]. Disponível em: http://www.who.int/whopes/Insecticides_for_space_spraying_Jul_2012.pdf?ua=1

World Health Organization – WHO. WHOPES-recommended compounds and formulations for control of mosquito larvae. [Internet]. 2013. [acceso 2016 dezembro 14]. Disponível em:

http://www.who.int/whopes/Mosquito_Larvicides_25_Oct_2013.pdf?ua=1

Wong Pei-Sze J, Li Mei-Zhi I, Chong Chee-Seng, Ng Lee-Ching, Tan Cheong-Huat. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): A Potential Vector of Zika Virus in Singapore. PLOS Neg Trop Diseases. 2013; 7(8)2348.

World Health Organization. 1997. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva. 84 pp. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/>.

Xu J, Bonizzoni M, Zhong D, Zhou G, Cai S, Li Y, Wang X, Lo E, Lee R, Sheen R, Duan J, Yan G, Chen X. Multi-country Survey Revealed Prevalent and Novel F1534S Mutation in Voltage-Gated Sodium Channel (VGSC) Gene in *Aedes albopictus*. Plos Negl Trop Dis. 2016; 10(5).

Zeidler JD, Acosta POA, Barrêto PP, Cordeiro JS. Virus dengue en larvas de *Aedes aegypti* y su dinámica de infestación, Roraima, Brasil. Rev Saúde Pub. 2008;42(6).

9 ANEXOS

9.1 Licença da Comissão de Ética de Uso de Animais



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-20/14

Certificamos que o protocolo (P-29/13-3), intitulado "Estudos da fisiologia, desenvolvimento e controle de artropodes vetores", sob a responsabilidade de JOSE BENTO PEREIRA LIMA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 31/03/2018 e inclui o uso total de :

Cavia porcellus

- 72 Machos de Short Hair.
- 72 Fêmeas de Short Hair.

Mus musculus

- 96 Machos de Swiss Webster.

Rio de Janeiro, 31 de março de 2014

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04626550

9.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: MONITORAMENTO E DISTRIBUIÇÃO DE MOSQUITOS: UMA PROPOSTA PARA AVANÇAR NO CONHECIMENTO E CONTROLE DE Aedes Aegypti e Aedes albopictus

Caro morador,

A dengue, o chikungunya e zika são os vírus mais importantes transmitidos por mosquitos, que podem causar doenças. Como ainda não existe tratamento específico e eficaz para as doenças, os métodos de controle é o combate ao mosquito.

Um estudo será desenvolvido com o objetivo de compreender a dinâmica dos mosquitos, visando desta forma, melhorar as ações de controle na ilha de Paquetá, município do Rio de Janeiro.

Dessa forma, pedimos que leia com bastante atenção os itens abaixo com relação às etapas do projeto:

01 – Do Estudo

Esse estudo será realizado em toda a ilha de Paquetá para avaliar a presença e distribuição do mosquito *Aedes*. Agentes de Vigilância em Saúde (AVS), da Prefeitura Municipal, devidamente identificados visitarão as residências da região. As casas visitadas, receberão armadilhas para a coleta de ovos do mosquito. O monitoramento das armadilhas será semanal, durante o período do estudo e os ovos coletados serão recolhidos e levados para o Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores do Instituto Oswaldo Cruz.

Esse estudo é uma parceria entre a Fundação Oswaldo Cruz e a Coordenação de Vigilância em Saúde do Município do Rio de Janeiro.

02 – Das Armadilhas

As armadilhas instaladas nas residências serão do tipo ovitrampa, especialmente desenvolvidas para a captura de ovos do mosquito transmissor da dengue, chikungunya e zika (*Aedes* sp.)

A armadilha é composta por um recipiente plástico de cor preta e fosca com 10 cm de diâmetro e 12 cm de altura. No interior da armadilha foi adicionado uma palheta de madeira fixada com clipe e 200 mL de água da

torneira e levedo de cerveja. A armadilha não atraí mosquitos apenas contribui para a detecção de fêmeas de mosquitos presente no ambiente.

IMPORTANTE: DEVE-SE EVITAR MEXER NA ARMADILHA, ou mesmo permitir que crianças e animais se aproximem. Apesar de não conter nenhum material tóxico que apresente risco de acidente.

Para garantir o perfeito andamento do projeto somente os Agentes de Vigilância em Saúde farão a instalação e retiradas das armadilhas.

03 – Dos Responsáveis

Qualquer dúvida em relação ao projeto ou mesmo qualquer problema relacionado às armadilhas, por favor, entre em contato com: Paula Borges, Thaís Nunes ou Dr. Bento Lima (21) 2580-6598.

04 – Da Declaração

a) Declaro para os devidos fins que recebi informações a respeito do projeto, sendo estas explicitadas neste documento por mim assinado;

b) Declaro que, para participar deste projeto, nenhum tipo de gratificação ou pagamento em dinheiro me foi oferecido, sendo de livre e espontânea vontade a minha participação e de minha família;

c) Declaro que tenho o direito de me retirar desse estudo a qualquer momento, sem qualquer tipo de retaliação ou danos.

d) Declaro que, uma vez lido e assinado o presente termo, cumprirei todas as recomendações com relação ao cuidado com as armadilhas.

e) Comprometo-me a avisar aos responsáveis pelo estudo, qualquer problema com relação ao funcionamento das armadilhas.

Local:	Data:
Nome do morador (legível):	
Assinatura do MORADOR:	Assinatura do ENTREVISTADOR:

Obrigado por sua participação!!!!

