

Diretriz para Avaliar a Resistência a Inseticida em Vetores Usando o Bioensaio com Garrafa do CDC



ÍNDICE

1. Introdução	5
2. Material e reagentes	5
2.1. Material	5
2.2. Reagentes	6
2.3. Material biológico	6
3. Considerações iniciais	7
3.1. Dose diagnóstica e tempo de diagnóstico	7
3.2. Preparação de soluções estoque	8
3.3. Preparação de mosquitos	9
3.4. Limpeza e secagem de frascos antes do revestimento com inseticida	10
3.5. Marcação de frascos	11
3.6. Revestimento de frascos	11
4. Método do bioensaio com garrafa do CDC	12
4.1. Considerações iniciais	12
4.2. Realização do bioensaio	13
4.3. Manuseio de frascos revestidos	15
4.4. Identificação de mecanismos de resistência	15
4.5. Validade dos dados	15
4.6. Interpretação dos resultados	16
5. Vigilância da resistência	18
5.1. Histórico	18
5.2. Características do aparecimento da resistência	18
5.3. Natureza focal da resistência	18
5.4. Resistência e controle de doenças	18
5.5. Princípios de orientação	19
6. Bioensaio com garrafa do CDC e sinergistas	19
6.1. Histórico	19
6.2. Utilização de sinergistas	21
6.3. Preparação de frascos para bioensaios com sinergista	22
6.4. Realização do bioensaio com garrafa do CDC com sinergista	22
6.5. Interpretação de bioensaios com sinergistas	23
7. Bibliografia	23
Apêndice 1. Perguntas freqüentes	24
Apêndice 2. Doses diagnósticas e calibração do bioensaio com garrafa do CDC	26
Apêndice 3. Ficha de resultados do bioensaio com garrafa do CDC	28

PREFÁCIO

A resistência a inseticidas em uma população de vetores é inicialmente detectada e caracterizada usando um tipo de bioensaio para determinar se um inseticida específico pode controlar um vetor em um determinado momento. Idealmente, esta pergunta fundamental deve ser respondida antes de um dado inseticida ser escolhido e obtido para controlar uma população de vetores.

O bioensaio com garrafa dos Centros para o Controle e Prevenção de Doenças (CDC, Centers for Disease Control and Prevention) dos Estados Unidos da América (EUA) é uma ferramenta de vigilância para detectar a resistência a inseticidas em populações de vetores. Foi concebido para ajudar a determinar se uma formulação específica de um inseticida pode controlar um vetor em um local específico em um determinado momento. Esta informação, combinada com os resultados de bioensaios usando sinérgicas e os de ensaios bioquímicos e moleculares, pode ajudar a determinar que outro inseticida pode ser usado uma vez que a resistência seja detectada.

A meta deste documento é fornecer uma diretriz laboratorial prática que descreve como realizar e interpretar o bioensaio com garrafa do CDC. Informações sobre outros testes de resistência podem ser obtidas no website do CDC em <http://www.cdc.gov/malaria>.

Esperamos que esta ferramenta seja útil no apoio a programas de controle vetorial.

Atenciosamente,

William G. Brogdon, PhD
Research Entomologist
Entomology Branch
Division of Parasitic Diseases and Malaria
Centers for Disease Control and Prevention

1600 Clifton Road, MS G-49
Atlanta, GA 30329 USA
Tel: +1 404.718.4303
Fax: +1 404.718.4355
E-mail: WBrogdon@cdc.gov

Adeline Chan, PhD
Research Entomologist
Entomology Branch
Division of Parasitic Diseases and Malaria
Centers for Disease Control and Prevention

1600 Clifton Road, MS G-49
Atlanta, GA 30329 USA
Tel: +1 404.718.4305
Fax: +1 404.718.4355
E-mail: AChan@cdc.gov

AGRADECIMENTO

Gostaríamos de agradecer às inúmeras pessoas que contribuíram para o desenvolvimento e a implementação deste método. Fica um agradecimento especial à Agência dos Estados Unidos para o Desenvolvimento Internacional (USAID, United States Agency for International Development) e à Organização Pan-americana de Saúde (PAHO, Pan-American Health Organization) por meio da Iniciativa Contra a Malária na Amazônia (AMI, Amazon Malaria Initiative) por adotar este método como parte desta iniciativa. Os cientistas e pessoal do programa de controle de muitos países investiram muita energia e recursos na coleta de dados de campo que permitiram o refinamento e a avaliação realística do método junto com outros métodos, como o bioensaio em papel da Organização Mundial de Saúde (WHO, World Health Organization). Apesar de serem muitos para que possamos mencionar individualmente, estas pessoas têm o nosso mais sincero agradecimento. Finalmente, gostaríamos de agradecer Alexandre Macedo de Oliveira, MD, PhD e Beatie Divine, MA, MBA pela análise cuidadosa deste documento e seu auxílio no processo editorial.

DIRETRIZ

1. Introdução

Bioensaios permitem a detecção e caracterização de resistência a inseticidas em uma população de vetores. Esta diretriz descreverá o bioensaio com garrafa dos Centros para o Controle e Prevenção de Doenças (CDC, Centers for Disease Control and Prevention) dos Estados Unidos da América (EUA), uma ferramenta para detectar a resistência a inseticidas. As informações fornecidas por este bioensaio combinadas com os resultados de bioensaios usando sinergistas e os de provas bioquímicas e moleculares podem também ajudar a determinar mecanismos associados com a resistência a inseticidas.

O bioensaio com garrafa do CDC baseia-se em dados de mortalidade, que correspondem ao intervalo de tempo que um inseticida demora para penetrar em um artrópode, atravessar seus tecidos intervenientes, chegar ao local alvo de ação e atuar neste. Qualquer coisa que impeça ou atrase o composto alcançar seu objetivo — matar insetos — contribui para a resistência. Informações derivadas do bioensaio com garrafa do CDC podem fornecer evidência inicial de que um inseticida está perdendo sua eficácia. Esta metodologia deve ser considerada para uso de rotina mesmo antes de um inseticida ser considerado e obtido para controle de um determinado vetor.

O bioensaio com garrafa do CDC pode ser realizado em populações de vetores coletados no campo ou em populações criadas em um insetário a partir de larvas coletadas no campo. Não é recomendável usar mosquitos que eclodiram de ovos postos em insetário.

Uma vantagem principal deste bioensaio é que diferentes concentrações de um inseticida podem ser avaliadas. Além disso, a técnica é simples, rápida e econômica, quando comparada a possíveis alternativas. O bioensaio com garrafa do CDC pode ser usado como parte de um programa amplo de monitoramento de resistência a inseticidas que pode incluir o bioensaio em papel da Organização Mundial de Saúde (WHO, World Health Organization) e métodos bioquímicos e moleculares.

O bioensaio com garrafa do CDC pode ser usado para qualquer espécie de insetos. Para a finalidade desta diretriz, mosquitos serão usados como um exemplo.

2. Material e reagentes

2.1. Material

- Frascos Wheaton de 250 ml com tampas com rosca (Figura 1). Cada bioensaio normalmente requer cinco frascos: quatro para réplicas e um para controle;
- Pipetas descartáveis de plástico graduadas que possam medir 1 ml, ou micropipetas e pontas;

- Capturador de Castro ou outro dispositivo com sucção para coletar mosquitos;
- Recipientes para transferir/manter mosquitos;
- Frascos para soluções estoque. Estes podem ser âmbar ou embrulhados em papel alumínio se forem usados frascos transparentes (100 ml a 1.000 ml dependendo do volume de solução estoque escolhido pelo usuário);
- Cronômetro capaz de contar os segundos;
- Marcadores permanentes para etiquetar frascos, tampas e pipetas;
- Fita adesiva para etiquetar frascos, tampas e pipetas;
- Luvas descartáveis;
- Folhas, canetas e lápis para registro de dados.

2.2. Reagentes

- Inseticida(s) a ser(em) testado(s) (grau técnico ou formulações);
- Acetona ou etanol absoluto de grau técnico.

2.3. Material biológico

- Mosquitos para testes.

Nota: Utilize procedimentos de segurança conforme recomendado pela sua instituição ao manusear inseticidas (por exemplo, luvas de procedimento, jaleco de laboratório).



Figura 1: Material e reagentes para o bioensaio com garrafa do CDC.

3. Considerações iniciais

3.1. Dose diagnóstica e tempo de diagnóstico

O primeiro passo para padronizar o bioensaio com garrafa do CDC é determinar a dose diagnóstica e o tempo de diagnóstico. A dose diagnóstica é uma dose de inseticida que mata 100% dos mosquitos suscetíveis dentro de um tempo específico. O tempo esperado para o inseticida alcançar este objetivo é chamado “tempo de diagnóstico”. Esses são os pontos de referência contra os quais todos os outros resultados são comparados. Supõe-se que exista resistência se uma parte considerável da população teste sobreviver à dose diagnóstica no tempo de diagnóstico.

A dose diagnóstica e o tempo de diagnóstico devem ser definidos para cada inseticida, cada região e cada espécie de vetor a ser monitorada. A validação da dose diagnóstica e do tempo de diagnóstico é feita usando uma população suscetível de vetores coletada no campo. Assim que a dose diagnóstica e o tempo de diagnóstico para uma espécie de um local específico forem determinados, estes parâmetros devem ser usados para testar aquela população de vetor específica daquele local a partir daquele momento. O uso dos mesmos parâmetros é necessário para detectar mudanças na resposta da população com o passar do tempo (por exemplo, número de mosquitos que sobrevivem a uma dose diagnóstica que no passado matou 100% da população de referência). Informações detalhadas sobre doses diagnósticas, tempos de diagnóstico e calibração do bioensaio com garrafa do CDC estão descritas no Apêndice 2.

Doses diagnósticas e tempos de diagnóstico foram determinados para mosquitos de muitas regiões geográficas. A Tabela 1 indica as doses diagnósticas e tempos de diagnóstico aplicáveis a populações de mosquitos *Anopheles* e *Aedes*. As doses diagnósticas e os tempos de diagnóstico para anofelinos indicadas abaixo foram acordadas para uso em anofelinos coletados na América do Sul como parte da Iniciativa Contra a Malária na Amazônia (AMI, Amazon Malaria Initiative). Estas doses e tempos, bem como os dados listados para *Aedes*, estão dentro do intervalo de doses diagnósticas e tempos de diagnóstico para uso mundial. Portanto, doses diagnósticas e tempos de diagnóstico na Tabela 1 servem como pontos de referência para os principais inseticidas usados globalmente. Pode ser necessário determinar as doses diagnósticas e os tempos diagnósticos para outros gêneros e espécies de vetores.

Inseticida	Concentração de inseticida por gênero (µg/frasco)		Tempo de diagnóstico (minutos)
	<i>Anopheles</i>	<i>Aedes</i>	
Bendiocarb	12,5	12,5	30
Ciflutrina	12,5	10	30
Cipermetrina	12,5	10	30
DDT	100	75	45
Deltametrina	12,5	10	30
Fenitrothion	50	50	30
Lambdacialotrina	12,5	10	30
Malation	50	50	30
Permetrina	21,5	15	30
Pirimifos-metil	20	—	30

Resumindo, o primeiro passo para padronizar o bioensaio com garrafa do CDC é determinar a dose diagnóstica e o tempo de diagnóstico. Esta etapa deve ser feita em nível nacional ou regional em um determinado país ou região para permitir a comparabilidade entre laboratórios diferentes com o passar do tempo. Assim que se determinaram a dose diagnóstica e o tempo de diagnóstico para um dado inseticida e espécie de mosquito, não existe necessidade de se refazer este exercício até que exista evidência de altos níveis de resistência nesta dada espécie.

3.2. Preparação de soluções estoque

Os frascos usados para o bioensaio precisam ser internamente revestidos com a dose diagnóstica do inseticida sob avaliação. Como pode ser observado na Tabela 1, a dose diagnóstica é uma quantia determinada de inseticida por frasco. Portanto, se 12,5 µg de deltametrina devem ser adicionados a um frasco teste, seria aconselhável ter uma solução estoque com 12,5 µg/ml, o que significa que 1 ml da solução conteria a quantia desejada de inseticida a ser adicionada ao frasco. Isto é equivalente a dizer que é mais prático fazer diluições predeterminadas de inseticidas, chamadas “soluções estoque”, na mesma concentração com a qual se deseja revestir os frascos.

Para fazer soluções estoque de inseticidas, dilua a quantia apropriada de inseticida (grau técnico [puro] ou formulação) em acetona ou etanol de grau técnico. Exemplos de quantidades de inseticida de grau técnico necessárias para preparar 100 ml, 500 ml e 1.000 ml de solução estoque estão indicados na Tabela 2. O inseticida de grau técnico pode ser sólido ou líquido, e deve ser de boa qualidade e estar dentro do seu prazo de validade. É importante etiquetar o frasco de solução estoque com o nome do inseticida, concentração e data de preparação. Exemplos de preparação de soluções estoque de grau técnico e formulações estão indicados no Quadro 1. Assim que a solução estoque estiver concluída, pode ser armazenada no refrigerador (4°C) em frascos à prova de luz (frascos de cor âmbar ou embrulhados em papel alumínio se forem transparentes) para uso futuro. No CDC, soluções estoque refrigeradas de vários inseticidas foram usadas por 2 a 3 anos sem perda de atividade. É recomendável retirar as soluções estoque do refrigerador pelo menos 1 hora antes de realizar o bioensaio para permitir que alcancem temperatura ambiente antes do uso. O frasco de solução estoque deve ser gentilmente agitado antes de ser usado para misturar seu conteúdo.

Inseticida	Peso (mg) de inseticida de grau técnico necessário por volume de solução estoque (<i>Anopheles</i>)			Peso (mg) de inseticida de grau técnico necessário por volume de solução estoque (<i>Aedes</i>)		
	100 ml	500 ml	1000 ml	100 ml	500 ml	1000 ml
Bendiocarb	1,25	6,25	12,5	1,25	6,25	12,5
Ciflutrina	1,25	6,25	12,5	1	5	10
Cipermetrina	1,25	6,25	12,5	1	5	10
DDT	10	50	100	7,5	37,5	75
Deltametrina	1,25	6,25	12,5	1	5	10
Fenitrothion	5	25	50	5	25	50
Lambdacialotrina	1,25	6,25	12,5	1	5	10
Malation	5	25	50	5	25	50
Permetrina	2,15	10,75	21,5	1,5	7,5	15
Pirimifos-metil	2	10	20	—	—	—

Quadro 1: Exemplos de preparação de solução estoque.

1. Preparação de soluções estoque usando inseticida de grau técnico (puro)

Considere um inseticida de grau técnico como deltametrina a 100%. Para obter uma concentração de 12,5 µg/frasco, dissolva 12,5 mg do inseticida em acetona ou etanol absoluto suficiente para fazer 1 litro de solução total. Cada 1 ml desta solução conterá 12,5 µg do inseticida. Soluções estoque de volumes variados (por exemplo, 100 ml) podem ser feitas para a conveniência do usuário, contanto que a proporção de inseticida e solvente permaneça constante.

2. Preparação de soluções estoque a partir de formulações que não inseticida de grau técnico

Para calcular o volume de uma formulação a ser adicionado ao solvente para alcançar a concentração desejada na solução estoque, é necessário considerar a concentração do ingrediente ativo na formulação. Para tanto, simplesmente divida a quantidade desejada de miligramas necessária para 1 litro da solução estoque pela concentração na formulação disponível. Isto fornecerá o volume da formulação necessário para fazer 1 litro de solução estoque. A fórmula:

$$\frac{\text{Miligramas de grau técnico}}{\% \text{ de ingrediente ativo na formulação}}$$

Exemplo:

Usando uma formulação com deltametrina a 10%, calcule quanto é necessário para obter 12,5 mg.

$$\text{Volume necessário} = \frac{12,5 \text{ mg}}{0,10} = 125 \text{ mg da formulação a } 10\%$$

Portanto, será necessário adicionar 125 mg de uma formulação de deltametrina a 10% em suficiente acetona ou etanol absoluto para fazer 1 litro de solução total. Desta forma, cada 1 ml da solução estoque conterá 12,5 µg de deltametrina.

3.3. Preparação de mosquitos

Mosquitos fêmeas a serem usados no bioensaio podem ser coletados como adultos do campo (com idade e estado fisiológico misturados) ou como adultos de uma idade conhecida criados a partir de larvas coletadas no campo. Não é recomendável usar mosquitos que eclodiram de ovos postos no insetário. Se forem usados adultos coletados em campo, seus estados fisiológicos (por exemplo, sem alimentação, parcialmente fecundados) devem ser registrados na ficha de resultados. Mosquitos fêmeas devem ser alimentados apenas com solução açucarada a 10% no dia anterior ao teste. É recomendável que pelo menos 100 mosquitos, divididos entre quatro frascos réplica, sejam testados para um inseticida a uma concentração específica. Quando não for possível coletar este número de mosquitos de uma única vez, os resultados de diversos bioensaios durante alguns dias podem ser agrupados para alcançar o tamanho de amostra indicado, ou seja, 100 mosquitos. Em qualquer caso, cada bioensaio precisa incluir um frasco controle com 10 a 25 mosquitos.

Algumas coletas de campo podem conter espécies diferentes. Portanto, as espécies devem ser identificadas antes ou depois da realização do bioensaio para validar seus resultados (Quadro 2). Para determinar a composição de espécies de coletas de mosquito antes do bioensaio, é possível “atordoar” (anestesiá-los) os mosquitos com acetato etílico.

Quadro 2: Orientação para situações onde existem espécies diferentes de mosquito na amostra.

No caso de haver espécies diferentes de mosquito numa amostra, é recomendável que as espécies sejam identificadas antes ou depois do bioensaio com garrafa do CDC. Se uma espécie predominante for detectada (mais de 95% da amostra pertencente a uma única espécie), considere esta como a espécie testada e os resultados do bioensaio com garrafa do CDC podem ser considerados adequados para a espécie predominante.

Se nenhuma espécie particular representar pelo menos 95% dos mosquitos sendo testados, ajuste os resultados para uma população heterogênea. Para alcançar isto:

1. Identifique as espécies e classifique-as antes do bioensaio usando acetato etílico. Realize bioensaios separados para cada espécie, ou espécie predominante; ou
2. Comece o bioensaio sem pré-identificação se esta não for possível (falta de experiência com “atordoamento” de mosquito ou presença de espécies relacionadas ou crípticas). Se houver mosquitos sobreviventes no tempo de diagnóstico, interrompa o bioensaio e separe os mosquitos vivos dos mortos. Identifique as espécies de mosquitos vivos e mortos e considere-as separadamente para análise.

3.4. Limpeza e secagem de frascos antes do revestimento com inseticida

- a) Lave os frascos com água morna e sabão. Enxágue completamente com água pelo menos três vezes. Água de torneira pode ser usada para esta etapa;
- b) Coloque os frascos em um forno ou estufa (50°C) por 15 a 20 minutos ou até que eles estejam completamente secos antes de usá-los;
- c) Se não houver nenhum forno ou estufa, seque os frascos completamente em temperatura ambiente ou ao sol, sem as tampas. Em situações úmidas, os frascos podem ser deixados para secar sem as tampas durante a noite ou por mais tempo;
- d) Para garantir a qualidade do procedimento de limpeza, introduza alguns mosquitos suscetíveis em uma amostra de frascos recentemente lavados e secos. Os mosquitos não devem morrer imediatamente. Se eles morrerem, repita o procedimento de lavagem e secagem.

3.5. Marcação de frascos

- a) Como os frascos serão utilizados novamente, considere marcá-los usando um pedaço de fita adesiva nos frascos e tampas em vez de escrever diretamente nos mesmos (Figura 2). Isto pode facilitar a limpeza dos frascos depois da conclusão do bioensaio;
- b) Marque um frasco e sua tampa como controle;
- c) Marque os outros quatro frascos e tampas com o número da réplica (1 a 4) e a data do bioensaio;
- d) Se mais de um tipo de inseticida ou mais de uma concentração do inseticida estiver sendo testado ao mesmo tempo, etiquete também os frascos e tampas com o nome e concentração do inseticida;
- e) Marque tampas e frascos de forma que frascos fiquem associados às suas respectivas tampas. Isto é importante porque o interior de todo o frasco será revestido, inclusive a parte interna da tampa.



Figura 2: Etiquetagem dos frascos e tampas.

Figure 2: Labeling bottles and caps.

3.6. Revestimento de frascos

- a) Verifique se os frascos e tampas estão completamente secos;
- b) Remova as tampas dos frascos;
- c) Se estiver usando pipetas descartáveis, etiquete uma pipeta como “solvente apenas” para o frasco controle e outra pipeta como “solução inseticida” para os frascos teste e use-as de acordo;
- d) Adicione 1 ml de acetona/etanol ao frasco controle e recoloque a tampa com firmeza;
- e) No primeiro frasco teste, adicione a quantidade de solução estoque de inseticida suficiente para alcançar a dose diagnóstica (Tabela 1). Por exemplo, se, como foi sugerido, a solução estoque tiver a mesma concentração de inseticida por ml que a dose diagnóstica, adicione 1 ml da solução estoque ao primeiro frasco teste. Recoloque a tampa com firmeza;
- f) Repita a ‘Etapa e’ com os outros três frascos teste;
- g) Gire o conteúdo dentro do frasco de forma que o fundo seja revestido (Figura 3);
- h) Inverta o frasco e gire-o para revestir a parte interna da tampa (Figura 4);
- i) Posicione o frasco de lado e aguarde por alguns segundos para deixar o conteúdo acumular na parte lateral do frasco. Rode levemente, balançando suavemente o frasco de forma que todos os lados fiquem completamente revestidos (Figura 5);



Figura 3: Revestimento do fundo do frasco.



Figura 4: Revestimento da parte superior do frasco.



Figura 5: Revestimento das laterais do frasco.



Figura 6: Secagem dos frascos.

- j) Repita isto com todos os frascos teste;
- k) Remova as tampas e continue girando os frascos de lado até que todos os sinais visíveis do líquido tenham desaparecido do interior do frasco e eles estejam completamente secos (Figura 6);
- l) Mantenha os frascos de lado e cubra-os com algo que os mantenha protegidos contra a luz;
- m) Se os frascos não forem usados imediatamente, armazene-os em um local escuro (como uma gaveta) sem as tampas para evitar condensação. Se for transportar frascos pré-revestidos, transporte os frascos fechados com as respectivas tampas. Informações adicionais sobre o armazenamento de frascos revestidos estão descritas na Seção 4.3.

4. Método do bioensaio com garrafa do CDC

4.1. Considerações iniciais

- a) Use um filtro no capturador de Castro (aspirador) para evitar aspirar mosquitos ou fragmentos de insetos;
- b) Sopre levemente para expelir os mosquitos para dentro dos frascos. Se soprar com muita força, os mosquitos podem ficar feridos batendo nas laterais do frasco e morrer antes do inseticida ter uma chance para fazer isto;
- c) Tenha cuidado para não tocar o interior do frasco com o capturador, pois isto pode contaminá-lo;
- d) Lembre-se que o número de mosquitos em cada um dos frascos teste não precisa ser exatamente igual;
- e) Determine a composição das espécies de mosquitos antes ou depois da realização do bioensaio (Quadro 2).

4.2. Realização do bioensaio

O bioensaio pode ser realizado com os frascos na posição vertical ou deitados lateralmente. O importante é seguir sempre os mesmos procedimentos.

Etapas:

- Usando o capturador, introduza 10 a 25 mosquitos no frasco controle. Não é necessário contar os mosquitos; o número exato não importa;
- Introduza 10 a 25 mosquitos em cada frasco teste; novamente, o número exato não importa (Figura 7);
- Inicie um cronômetro. Verifique os frascos no Tempo 0 e conte o número de mosquitos mortos e/ou vivos;



Figura 7: Transferência de mosquitos para frascos revestidos com inseticida.



Figura 8: Bioensaio com garrafa do CDC em andamento.

- d) Se você encontrar mosquitos mortos no Tempo 0, faça uma anotação sobre eles na ficha de resultados (Apêndice 3);
- e) Registre quantos mosquitos estão mortos ou vivos, o que for mais fácil de contar, a cada 15 minutos até estarem todos mortos ou até 2 horas (Figura 8). Não é necessário continuar o bioensaio além de 2 horas;
- f) Registre estes dados na ficha de resultados (Apêndice 3);
- g) Faça um gráfico do percentual de mortalidade total (eixo Y) contra o tempo (eixo X) considerando todas as réplicas juntas;
- h) Lembre-se que a mortalidade no tempo de diagnóstico é o valor mais essencial porque representa o limiar entre a suscetibilidade e a resistência. Consulte a Tabela 1 para verificar os tempos de diagnóstico para cada dose diagnóstica dos inseticidas normalmente usados;
- i) Considere a mortalidade no frasco controle na segunda hora (término do bioensaio) ao relatar os resultados do bioensaio (Seção 4.5). Use a fórmula de Abbott para corrigir os resultados se a mortalidade na segunda hora no frasco controle estiver entre 3% e 10%. Pode ser necessário descartar os resultados do bioensaio se a mortalidade no frasco controle no término do teste for superior a 10%.

Os mosquitos são considerados mortos se não conseguirem mais ficar em pé. Consulte o Quadro 3 para obter informações adicionais.

Um cronômetro pode ser iniciado para cada frasco, mas é suficiente iniciar um cronômetro quando o primeiro ou o último frasco receber seus mosquitos. Entretanto, é importante seguir sempre o mesmo procedimento para iniciar o cronômetro. Mosquitos vivos no tempo de diagnóstico (Tabela 1) evidenciam a presença de resistência dos mesmos ao inseticida sendo testado. Estes mosquitos podem ser transferidos para uma gaiola entomológica (gaiola ou caixa com abertura para os braços) para análise adicional (por exemplo, provas moleculares ou bioquímicas). Pode ser necessário matar os mosquitos voando no término do bioensaio no frasco controle para obter uma contagem precisa. É possível matar os mosquitos por meio de congelamento ou atordoamento com agentes químicos.

Quadro 3: Observações sobre critérios de mortalidade.

- Mosquitos “mortos” são mosquitos que não ficam em pé.
- Girar o frasco levemente ajuda no processo de contagem.
- Mosquitos imóveis que deslizam ao longo da curvatura do frasco podem ser facilmente categorizados como mortos.
- É mais fácil contar o número de mosquitos mortos nas primeiras leituras do bioensaio, porém é mais fácil contar o número de mosquitos vivos em etapas mais adiantadas do bioensaio, quando poucos mosquitos estão vivos.
- Ao final do bioensaio, o percentual de mosquitos mortos no tempo de diagnóstico (mosquitos mortos/total de mosquitos no ensaio) é valor mais importante no gráfico.

4.3. Manuseio de frascos revestidos

Mais de um grupo de mosquitos pode ser testado num mesmo frasco em um dia. Porém, o principal fator limitante para usar frascos previamente revestidos mais de uma vez é a formação de umidade dentro dos mesmos, condensação, resultante de introduções sucessivas de mosquitos, especialmente em áreas de clima úmido. Se os frascos forem usados mais de uma vez no mesmo dia, um intervalo de pelo menos 2 a 4 horas entre os bioensaios é recomendável para que os frascos, sem as tampas, possam secar. Se os frascos forem usados novamente no dia seguinte, os frascos devem ser deixados para secar sem as tampas durante a noite protegidos contra luz direta. **Não é permitido secar frascos no forno ou estufa depois de estarem revestidos com inseticida.**

Se os frascos não forem usados logo depois de estarem revestidos com inseticida, estes devem ser secos sem as tampas. Uma vez secos, frascos devem ser armazenados em um local escuro (como uma gaveta) sem as tampas. Dependendo do inseticida usado, os frascos podem ser armazenados de 12 horas a 5 dias desta maneira. O tempo durante o qual os frascos podem ser armazenados depende do inseticida. Frascos revestidos com resmetrina e Naled não podem ser armazenados, portanto devem ser usados imediatamente depois de serem preparados. Frascos revestidos com organofosforados devem ser usados dentro de 24 horas. Para verificar se um frasco armazenado ainda é adequado, é possível colocar alguns mosquitos sabidamente suscetíveis no frasco. Se eles morrerem no prazo esperado (dentro do tempo de diagnóstico), o frasco ainda pode ser usado. Frascos podem ser revestidos em um laboratório central e podem ser transportados para uso no campo. Durante o transporte, os frascos devem estar com as tampas rosqueadas.

4.4. Identificação de mecanismos de resistência

Supõe-se que resistência esteja presente se uma parte considerável da população teste sobreviver à dose diagnóstica no tempo de diagnóstico. Os mosquitos que sobrevivem ao bioensaio podem ser usados para a identificação de mecanismos de resistência usando ensaios enzimáticos ou métodos moleculares. Os mosquitos sobreviventes podem ser facilmente transferidos dos frascos para dentro de uma gaiola entomológica para separá-los dos mortos durante o bioensaio com garrafa do CDC. Mosquitos a serem usados em ensaios enzimáticos devem ser armazenados congelados. Mosquitos a serem usados para estudos moleculares podem ser congelados, secos ou armazenados em etanol a 70% (ou superior). Além disso, pode ser necessário usar produtos como RNALater® (Applied Biosystems [Ambion], Foster City, Califórnia) para preservar amostras para medição de níveis de RNA (ácido ribonucleico) associados com mecanismos enzimáticos ativados (up-regulated).

4.5. Validade dos dados

Com a prática, a mortalidade dos mosquitos no frasco controle no término do bioensaio (2 horas de exposição) deverá ser zero. Na maioria dos casos, uma mortalidade de até 3% no frasco controle pode ser ignorada. Em casos onde a mortalidade for de 3% a 10% no frasco controle no término do bioensaio, é possível usar a fórmula de Abbott para corrigir as constatações (Quadro 4), ou descartar os resultados e repetir o bioensaio. Se a mortalidade no frasco controle for superior a 10% ao término do bioensaio, os resultados deste ensaio específico devem ser descartados e o bioensaio com garrafa do CDC deve ser repetido. Se uma amostra de mosquitos for insubstituível e o bioensaio não puder ser repetido, a fórmula de Abbott pode ser considerada mesmo quando a mortalidade no frasco controle for superior a 10%.

Quadro 4: Fórmula de Abbott.

Mortalidade corrigida =

$$\frac{(\text{mortalidade nos frascos teste [\%]} - \text{mortalidade no frasco controle [\%]}) \times 100}{(100\% - \text{mortalidade no frasco controle [\%]})}$$

Por exemplo: Se a mortalidade nos frascos teste for 50% no tempo de diagnóstico e a mortalidade no frasco controle for de 10% ao término do bioensaio, a mortalidade corrigida será $[(50\% - 10\%) / (100\% - 10\%)] \times 100 = 44.4\%$.

Observação: Em casos de 100% de mortalidade nos frascos teste, a fórmula de Abbott não tem nenhum efeito. Por exemplo: $[(100\% - 10\%) / (100\% - 10\%)] \times 100 = 100\%$ de mortalidade corrigida.

4.6. Interpretação dos resultados

Como com qualquer outro bioensaio de resistência, os dados do bioensaio com garrafa do CDC usando mosquitos teste precisam ser comparados com dados de mosquitos suscetíveis ou de uma população que servirá como linha de base. Os limiares de resistência para cada inseticida podem ser determinados calibrando o bioensaio com garrafa do CDC (Apêndice 2). A calibração corresponde a determinar a dose diagnóstica e o tempo de diagnóstico para uma espécie específica em uma determinada região que corresponde à dose e ao tempo nos quais todos os mosquitos suscetíveis morrem (Figura 9). Se mosquitos teste sobreviverem além deste limiar, estes sobreviventes representam uma proporção da população que tem algo permitindo que o inseticida demore a alcançar o local designado e aja. Em outras palavras, eles têm algum grau de resistência. No exemplo indicado na Figura 9, todos os mosquitos que morreram antes do tempo de diagnóstico quando expostos aos frascos revestidos com inseticida eram suscetíveis. Os mosquitos teste que sobreviveram além do limiar do tempo de diagnóstico possuíam algum grau de resistência. No exemplo, apenas 23% da população teste eram suscetíveis. Recomendações para interpretação de dados do bioensaio estão indicadas no Quadro 5. A informação mais importante é a mortalidade no tempo de diagnóstico, mas o bioensaio deve ser executado além do tempo de diagnóstico para avaliar a intensidade da resistência.

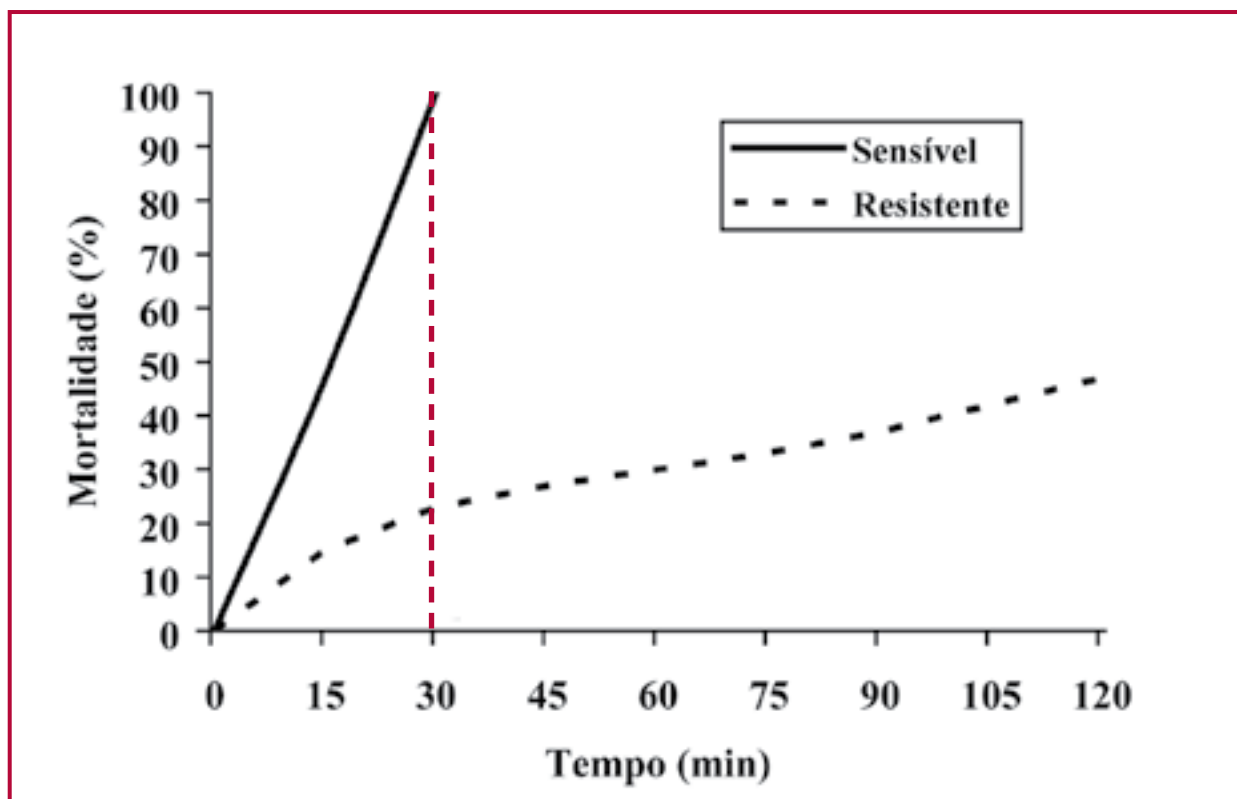


Figura 9: Determinação do limiar de resistência.

Quadro 5: Interpretação dos dados com propósitos de gestão.

A Organização Mundial de Saúde (WHO, World Health Organization) recomenda avaliar a importância da resistência detectada:

- Mortalidade de 98% a 100% no tempo de diagnóstico recomendado indica suscetibilidade;
- Mortalidade de 80% a 97% no tempo de diagnóstico recomendado sugere a possibilidade de resistência que precisa ser confirmada;
- Mortalidade <80% no tempo de diagnóstico recomendado sugere resistência.

Observação: Nos casos onde a mortalidade no tempo de diagnóstico for <95% em bioensaios que foram realizados sob condições ideais e com um tamanho de amostra de mais de 100 mosquitos, pode-se suspeitar fortemente da existência de resistência.

5. Vigilância da resistência

5.1. Histórico

Apesar de frequentemente haver uma coleta de dados de resistência como parte de programas de controle vetorial, isto não é feito tão regularmente quanto deveria ser em um verdadeiro esforço de vigilância de resistência. Vigilância exige coleta e interpretação regulares de dados epidemiológicos para apoiar mudanças em programas de saúde pública. É importante considerar o bioensaio com garrafa do CDC como um instrumento para coletar informações para apoiar um sistema de vigilância de resistência a inseticidas. Os dados de resistência são muito valiosos quando coletados ao longo do tempo para permitir comparações e monitoramento de tendências.

Há que se considerar como as informações de um sistema de vigilância de resistência a inseticidas serão usadas. A maioria dos programas de controle de malária avalia cuidadosamente a eficácia de seu programa de controle vetorial por meio da representação gráfica da incidência de casos de malária ou da coleta de mosquitos adultos e/ou larvas em locais sentinela. A integração de dados de resistência a inseticida e outros tipos de dados relacionados à malária precisam ser considerados antes de se propor e implementar estratégias de controle para resistência a inseticida.

5.2. Características do aparecimento da resistência

Fatores genéticos, biológicos e operacionais influenciam o desenvolvimento da resistência a inseticidas. Em muitos aspectos, a resistência é um problema complexo, com possíveis resultados distintos em uma área particular, dependendo da influência de fatores diferentes nas condições iniciais. Mesmo assim, certos fatores afetam o desenvolvimento da resistência em todo o mundo. As principais características da resistência estão descritas abaixo, mostrando porque cada manifestação de resistência é potencialmente exclusiva e, portanto, deve ser avaliada caso a caso.

5.3. Natureza focal da resistência

Os profissionais de controle vetorial frequentemente supõem que a resistência em uma espécie particular ocorre em toda a área de controle, mas a resistência a inseticida pode ser focal. Na Guatemala, locais sentinela de *Anopheles albimanus* separados apenas por alguns quilômetros variaram não apenas pela presença ou ausência de resistência, mas também pelo nível da resistência e pelo mecanismo de resistência predominante. Em geral, as áreas ativas de controle vetorial tendem a ter níveis mais altos de resistência. Quando os níveis de resistência em áreas adjacentes são comparados, os níveis podem ser mais altos nas áreas de controle vetorial mais intensivo.

5.4. Resistência e controle de doenças

Em alguns casos, estratégias de controle vetorial em uma determinada área podem não ser afetadas pelo nível de resistência a inseticidas. Por exemplo, um programa de controle pode conseguir controlar apenas 75% da população de vetores. Nestes casos, um nível de resistência a inseticida inferior a 10% provavelmente não afetará os esforços de controle da doença. Em tal situação, seria suficiente aumentar a vigilância e monitorar a resistência com maior frequência, sem nenhuma mudança nas estratégias de controle.

5.5. Princípios de orientação

Em termos gerais, a vigilância da resistência deve ser realizada em áreas onde a transmissão da doença é uma preocupação e onde medidas de controle com base em inseticida são contempladas, idealmente antes da compra do inseticida. Além das restrições impostas por recursos econômicos, o número de locais que podem ser amostrados depende altamente do tamanho da área contemplada para uso de inseticida. Devido à natureza potencialmente focal da resistência, esforços devem ser feitos para escolher locais espacialmente distribuídos na área de interesse, se for possível. Áreas com uma distância entre as mesmas de 20 km ou mais não devem ser consideradas como tendo padrões similares de resistência. Outro meio para decidir sobre os locais de vigilância é focalizar nas áreas de transmissão ativa da doença. Mesmo se apenas um ou poucos locais puderem ser monitorados, isto é muito mais preferível a não ter nenhum local sob vigilância. Além disso, esforços devem ser feitos para coletar informação nestes locais durante pelo menos alguns anos consecutivos, considerando que os dados comparativos são as informações mais significativas.

Idealmente cada local deve ser monitorado uma vez por ano. Naqueles locais onde os esforços de controle forem sazonais, pode ser útil monitorar no princípio e no término da estação de controle. Isto não se aplica a situações como o uso de mosquiteiros tratados com inseticida, onde a exposição ao inseticida é perene durante todo o ano. Se diferentes vetores numa área forem sazonais, a programação do teste de resistência deve ser ajustada às espécies de interesse.

Também é importante considerar que será necessário tentar identificar mecanismos de resistência assim que a resistência for detectada com o bioensaio com garrafa do CDC, quer usando o bioensaio com garrafa do CDC com sinergistas, quer usando métodos bioquímicos e/ou moleculares. Decisões sobre para qual inseticida trocar uma vez que a resistência a um dado inseticida é detectada dependerá do mecanismo de resistência presente em cada caso.

Finalmente, alguns países consideram útil centralizar a preparação de frascos e a organização administrativa da vigilância. Um laboratório de referência central pode fornecer o auxílio técnico e a garantia de qualidade. Também pode servir como um laboratório de referência para treinamento, fornecimento de materiais, identificação de espécies, e ensaios enzimáticos e métodos moleculares para determinação dos mecanismos de resistência.

6. Bioensaio com garrafa do CDC e sinergistas

6.1. Histórico

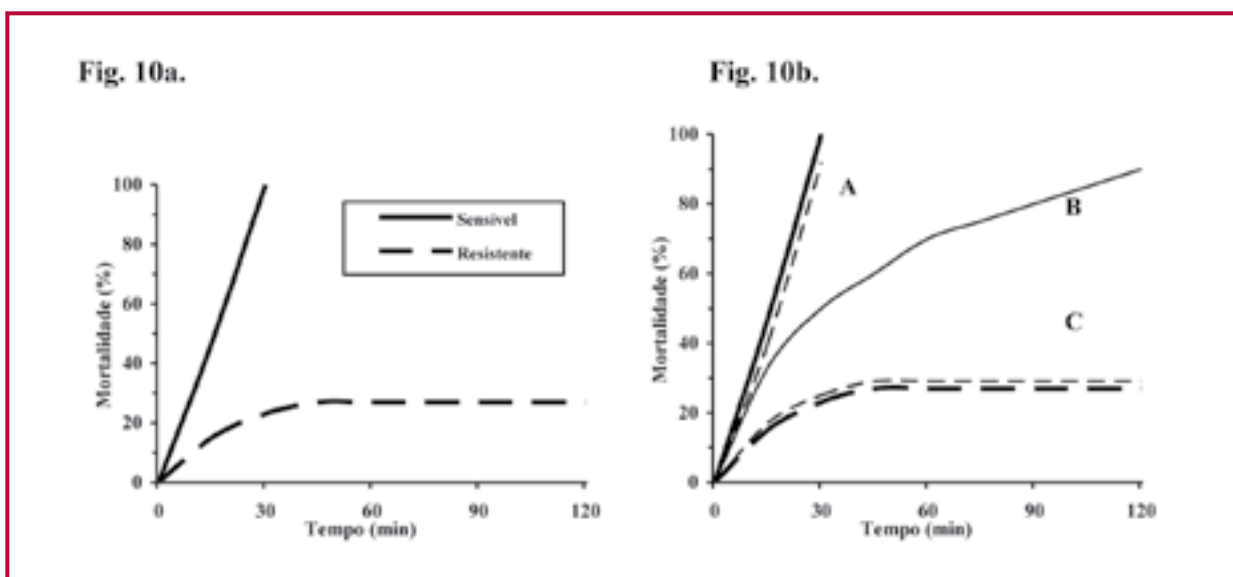
O bioensaio com garrafa do CDC usando frascos que foram revestidos com um único inseticida fornece informação sobre a resistência àquele inseticida específico em vetores adultos. Estes dados podem fornecer uma evidência precoce de que um inseticida está perdendo a sua eficácia.

Assim que a resistência for detectada, ou pelo menos suspeitada, o profissional precisa decidir o que fazer depois e que outros compostos têm a probabilidade de ainda serem eficazes e não comprometidos por resistência cruzada. Isto requer conhecimento de possíveis mecanismos de resistência existentes, informação normalmente adquirida usando tanto métodos bioquímicos (microplaca) quanto moleculares. Uma alternativa rápida e econômica para avaliar mecanismos de resistência é usar o bioensaio com garrafa do CDC com sinergistas. Sinergistas são inibidores de enzimas de inativação de inseticidas. Há sinergistas disponíveis para esterases, oxidases, e glutationa-S-transferases.

Sinergistas agem eliminando a resistência observada no bioensaio com garrafa do CDC se a enzima de inativação em questão tiver um papel naquele mecanismo de resistência particular (Figuras 10a e 10b). Dados de populações resistentes e suscetíveis estão indicados (Figura 10a). Assim que um sinergista for usado na população resistente, pode acontecer uma de três coisas (Figura 10b):

- A resistência ao inseticida é eliminada (linha A de mortalidade), o que sugere que o mecanismo relacionado àquele sinergista tem papel primordial na resistência a inseticida observada;
- A resistência ao inseticida é parcialmente eliminada (linha B de mortalidade). Isto sugere que o mecanismo relacionado àquele sinergista está envolvido na resistência, mas não é o único mecanismo envolvido neste caso específico;
- A resistência ao inseticida não é afetada (linha C de mortalidade). Isto indica que o mecanismo relacionado àquele sinergista não está envolvido neste caso de resistência.

Também é possível determinar se um mecanismo com local de ação específico, como a presença do gene *kdr* (mutação do canal de sódio) ou de acetilcolinesterase insensível, está envolvido. Isto é feito usando sinergistas em combinação. O uso de sinergistas em combinação não abole a resistência a inseticidas nos bioensaios quando um mecanismo com local de ação específico está presente. É crucial avaliar o papel relativo de mecanismos de inativação e aqueles com local de ação específico envolvidos num caso particular de resistência em áreas onde piretróides e/ou DDT são usados. Um mecanismo com local de ação específico confere resistência cruzada entre DDT e piretróide, enquanto mecanismos de inativação pode ou não conferir resistência cruzada. É necessário, portanto, o conhecimento do mecanismo de resistência envolvido para selecionar um inseticida substituto.



Figuras 10a e 10b. Efeitos de sinergistas em populações resistentes. A Figura 10a indica os dados de uma população de vetores resistentes comparada a uma população suscetível. A Figura 10b indica os três possíveis resultados da exposição do sinergista (Linha A: Resistência ao inseticida é eliminada; Linha B: Resistência ao inseticida é eliminada parcialmente; e Linha C: Resistência ao inseticida não é afetada).

6.2. Utilização de sinergistas

Sinergistas rotineiramente usados junto com o bioensaio com garrafa do CDC:

- Butóxido piperônico (PBO), que inibe a atividade da oxidase;
- S.S.S-tributilfosforotrioato (DEF), que inibe a atividade da esterase;
- Ácido etacrínico (EA), dietil-maleato (DM) e clorofenol (CF), que inibem a atividade da glutatona-transferase.

Também é possível usar uma combinação dos sinergistas acima. Testar mosquitos com sinergistas é um procedimento feito em duas etapas. Primeiro, os mosquitos são expostos ao(s) sinergista(s) durante 1 hora e depois testados com relação à resistência ao inseticida usando o bioensaio com garrafa do CDC. Uma representação esquemática da realização de um bioensaio com sinergista(s) está ilustrada na Figura 11.

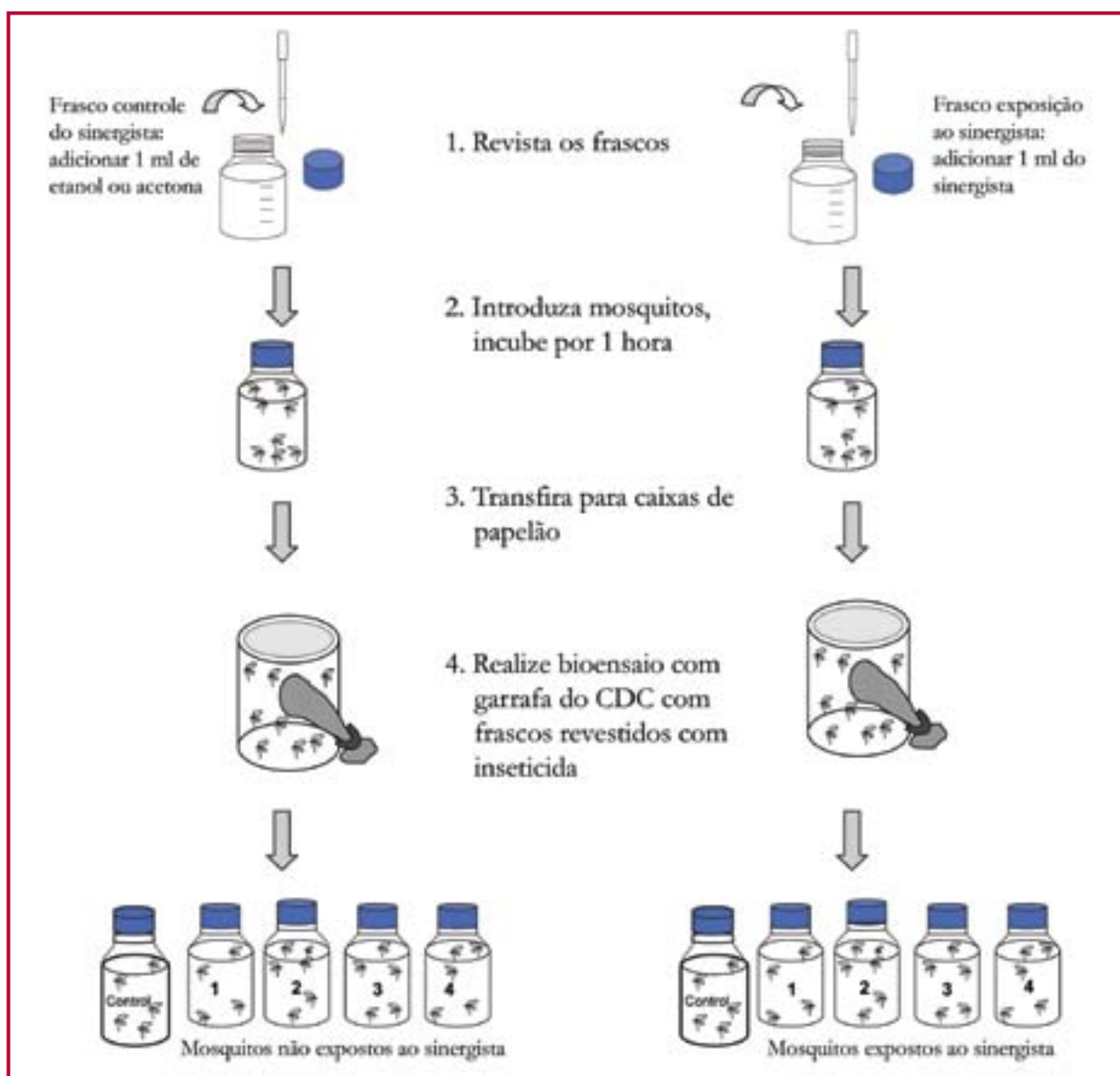


Figura 11. Realização do bioensaio com garrafa do CDC com sinergistas.

6.3. Preparação de frascos para bioensaios com sinergista

Para realizar o bioensaio com sinergistas:

- Prepare a solução estoque com sinergista diluindo a quantia apropriada de sinergista em acetona ou etanol de grau técnico para poder revestir os frascos com as concentrações indicadas na Tabela 3. Para fazer estas soluções estoque, use o mesmo procedimento utilizado para fazer soluções estoque com inseticidas (Seção 3.2). Em resumo, dilua a quantia apropriada de sinergista em acetona ou etanol de grau técnico. Para obter uma concentração de 400 µg/frasco de butóxido piperonílico, dissolva 400 mg em acetona ou etanol absoluto suficiente para fazer 1 litro de solução. Cada 1 ml desta solução conterá 400 µg de butóxido piperonílico.
- Marque um frasco e a sua respectiva tampa como o frasco controle do sinergista (sem sinergista);
- Marque um segundo frasco e sua tampa como frasco exposição ao sinergista;
- Adicione 1 ml de acetona ou etanol ao frasco controle de sinergista e recoloque a tampa com firmeza;
- Adicione 1 ml da solução estoque de sinergista ao frasco de exposição ao sinergista e recoloque a tampa com firmeza;
- Aplique o revestimento nos frascos, remova as tampas e deixe os frascos secando conforme descrito na Seção 3.6;
- Prepare dois conjuntos de frascos para realizar o bioensaio com garrafa do CDC (Seção 3.6).

Sinergista	Concentração de sinergista (µg/frasco)
Clorofenol	80
Dietyl-maleato	80
Ácido etacrínico	80
Butóxido piperonílico	400
S.S.S-tributilfosforotritioato	125

6.4. Realização do bioensaio com garrafa do CDC com sinergista

Para realizar o bioensaio com garrafa do CDC com sinergistas:

- Introduza números iguais de mosquitos no frasco controle de sinergista e no frasco de exposição ao sinergista (aproximadamente 125 mosquitos em cada frasco);
- Mantenha os mosquitos nos frascos durante 1 hora para permitir que o sinergista aja;

- c) Depois de concluir a exposição de 1 hora, transfira os mosquitos para duas gaiolas, uma para os mosquitos de controle de sinergista e outra para os mosquitos expostos ao sinergista. Isto facilita a transferência dos mosquitos para os frascos tratados com inseticida;
- d) Realize o bioensaio com garrafa do CDC como descrito na Seção 4.2 usando um conjunto de frascos revestidos com inseticida (um controle e quatro teste) para os mosquitos controle de sinergista e outro conjunto (um controle e quatro teste) para os mosquitos expostos ao sinergista;
- e) Compare os dados das duas populações de mosquitos teste.

6.5. Interpretação de bioensaios com sinergistas

A Seção 6.1 e as Figuras 10a e 10b fornecem informações sobre como interpretar os resultados do bioensaio com garrafa do CDC usando sinergistas. A resistência que não puder ser atribuída a um dos mecanismos de desintoxicação depois de utilizar todos os sinergistas provavelmente é devida a um mecanismo com local de ação determinado, como kdr (mutação do canal de sódio) ou acetilcolinesterase insensível.

7. Bibliografia

1. Brogdon, WG and McAllister JC, 1998. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 14(2):159–64.
2. National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Evaluating mosquitoes for insecticide resistance: Ensino via Web. Disponível em: <http://www.cdc.gov/malaria>.
3. Zamora Perea E, Balta Leon R, Palomino Salcedo M, Brogdon W, Devine G, 2009. Adaptation and evaluation of the bottle assay for monitoring insecticide resistance in disease vector mosquitoes in the Peruvian Amazon. *Malar. J.* 8: 208.

APÊNDICES

Apêndice 1. Perguntas frequentes

1. O que acontece se não houver número suficiente de mosquitos para um bioensaio completo?

Quando o número de mosquitos capturados no campo é insuficiente para um bioensaio completo (quatro frascos teste e um controle), é possível reduzir o número de frascos para teste, mas cada bioensaio SEMPRE deve ser realizado com um controle até a conclusão do número requerido. Se o teste for realizado por um longo período de tempo, use frascos recentemente revestidos se necessário. Consulte o tempo de vida útil esperado dos frascos revestidos no corpo deste documento. Salvo no caso de frascos revestidos com organofosforados, os frascos revestidos podem ser usados diversas vezes durante vários dias até a conclusão do bioensaio, contanto que não exista excessiva condensação dentro dos mesmos.

2. Alguns frascos devem ser designados exclusivamente como frascos controle?

Não, alguns frascos não devem ser designados como frascos controle. Os frascos devem ser atribuídos aleatoriamente como frascos teste ou controle. Isto fornecerá um controle de qualidade adicional à adequação do procedimento de lavagem.

3. O que fazer se não houver mosquitos suscetíveis disponíveis para calibração do bioensaio com garrafa do CDC?

A dose diagnóstica e tempo de diagnóstico para uma espécie específica em uma determinada área é semelhante. Use a dose diagnóstica e o tempo de diagnóstico publicados nesta diretriz, ou consulte os autores desta diretriz ou outros usuários com experiência no método para aquele vetor específico. Observe que o valor do bioensaio com garrafa do CDC está em exibir alterações nas características de populações de vetor com o passar do tempo. Portanto, uma linha de base é útil mesmo se alguns mosquitos já mostrarem resistência quando a linha de base inicial for estabelecida.

4. Mosquitos machos podem ser usados para o frasco de controle?

Não, machos não devem ser usados nos frascos controle. Alguns mecanismos de resistência são vinculados ao sexo e o usuário pode ser confundir-se ao usar machos no frasco controle. Além disso, a maioria dos mosquitos coletados deverá ser fêmea.

5. Como os mosquitos podem ser introduzidos no frasco sem deixar outros mosquitos escaparem?

Algumas pessoas consideram útil usar um pouco de algodão contra o tubo de aspiração no topo do frasco quando os mosquitos estão sendo introduzidos nos frascos. Conforme o capturador (aspirador) é retirado depois da introdução dos mosquitos, o algodão pode ser usado para fechar o topo do frasco até a tampa ser colocada. Em nossa experiência, um sopro de ar rápido e decisivo introduzirá os mosquitos sem fuga. Tentar introduzir mosquitos em um frasco mais do que uma vez pode permitir que alguns escapem. Isto pode ocorrer se o usuário tentar colocar um número exato de mosquitos em cada frasco, o que não é necessário.

6. O que acontece se houver mosquitos alimentados e não alimentados entre os mosquitos coletados no campo para utilização no bioensaio?

Uma coleta de campo de mosquitos pode conter mosquitos fêmeas em vários estados fisiológicos, por exemplo, mosquitos alimentados e não alimentados. Existem duas maneiras de se lidar com isto. Primeiro, os mosquitos podem ser selecionados aleatoriamente. Alternativamente, os mosquitos podem ser guardados por um ou dois dias para que a alimentação de sangue seja digerida antes de serem usados para o bioensaio.

Apêndice 2. Doses diagnósticas e calibração do bioensaio com garrafa do CDC

Supõe-se que a resistência esteja presente se uma dose diagnóstica, comprovada e validada contra uma população suscetível de mosquitos, for sobrevivida por membros de uma população teste em um tempo de diagnóstico predeterminado. A dose diagnóstica e o tempo de diagnóstico são parâmetros ideais para detectar a resistência ao inseticida. Uma dose diagnóstica muito baixa não matará mosquitos suscetíveis durante o bioensaio, fornecendo um resultado falso-positivo para resistência. Por outro lado, uma dose diagnóstica muito alta matará mosquitos resistentes durante o bioensaio, mascarando a resistência.

Para alguns vetores de algumas regiões geográficas, já foram determinadas doses diagnósticas e tempos de diagnóstico para vários inseticidas. É recomendável que os países nestas regiões usem os parâmetros já estabelecidos para permitir a comparação de achados de diferentes países ou regiões. Entretanto, se esta informação não estiver disponível, a dose diagnóstica e o tempo de diagnóstico precisarão ser definidos para cada inseticida, em cada região e para cada espécie de vetor sendo monitorada. Para determinar a dose diagnóstica e o tempo de diagnóstico para utilização no bioensaio com garrafa do CDC, o ensaio terá que ser calibrado.

Ensaio de calibração

O ensaio é calibrado selecionando-se a população teste e possíveis durações de tempo de teste, e depois determinando possíveis doses diagnósticas, de acordo com tempos de diagnóstico preferidos.

População: A primeira etapa é selecionar uma população de vetor suscetível para usar como linha de base. Se tal população não estiver disponível, é possível usar a população de vetor da área onde as medidas químicas de controle vetorial serão aplicadas. Este será o ponto de referência contra o qual todas as populações futuras deverão ser comparadas.

Tempo de diagnóstico: Por razões práticas, o tempo de diagnóstico deve ficar entre 30 e 60 minutos.

Dose diagnóstica: A dose diagnóstica será uma dose de inseticida que mata 100% dos mosquitos em algum momento entre 30 e 60 minutos e que esteja abaixo do ponto de saturação. Para determinar possíveis doses diagnósticas, primeiro prepare frascos com diferentes concentrações de inseticida por frasco, conforme descrito nesta diretriz. Usando cada um destes frascos, realize diferentes bioensaios com garrafa do CDC com 25 mosquitos da população suscetível para determinar o limite superior (nível máximo permitido) da dose diagnóstica, que é o ponto de saturação. O ponto de saturação pode ser definido como uma concentração acima da qual nenhuma redução no tempo requerido para matar todos os mosquitos ocorre mesmo quando se aumenta a concentração de inseticida. Consulte uma explicação mais detalhada sobre como determinar o ponto de saturação abaixo.

Pode ser necessário realizar conjuntos adicionais de concentrações ao redor deste intervalo até que a dose diagnóstica ideal seja determinada. Por exemplo, comece com 10 µg/frasco e faça incrementos de 5 µg, até atingir 200 µg/frasco. Se nenhum ponto de saturação claro puder ser determinado, realize mais ensaios usando frascos com <10 µg/frasco e/ou >200 µg/frasco, com incrementos de 5 µg. Se ainda nenhum ponto de saturação puder ser determinado, mais bioensaios devem ser realizados com garrafas usando incrementos menores de inseticida.

Interpretação de dados de calibração

Representando em gráfico os resultados do ensaio de calibração mostrará que a linha tempo-mortalidade fica mais reta, mais íngreme e move em direção ao eixo Y conforme a concentração de inseticida aumenta (Figura). Isto significa que, aumentando a concentração do inseticida, a linha mortalidade alcançará um ponto onde aumentar a concentração do inseticida não matará mais rapidamente todos os mosquitos. No exemplo abaixo, 15 µg/frasco é o ponto de saturação toxicológica para o inseticida entrar no mosquito e alcançar seu objetivo. Aumentar a concentração para 25 µg/frasco não fará com que o inseticida penetre no mosquito, alcance o local de ação e mate o mosquito com mais rapidez. Portanto, 15 µg/frasco é o ponto de saturação e a concentração máxima para usar como dose diagnóstica. Do contrário existe um risco que os mosquitos resistentes sejam mortos por doses mais altas do que o ponto de saturação e sejam, assim, registrados como suscetíveis, ou seja, resultados falso-negativos para resistência.

Uma concentração ligeiramente inferior comparada ao ponto de saturação toxicológica matará mosquitos em um período talvez mais conveniente para o usuário (por exemplo, 30 a 60 minutos). Assim, é possível escolher uma dose diagnóstica menor que mate 100% dos mosquitos dentro do intervalo de 30 a 60 minutos. Deve ficar claro que vários pares diferentes de doses diagnósticas e tempos de diagnóstico fornecerão resultados interpretáveis, mas é necessário usar a mesma dose diagnóstica e tempo de diagnóstico para aquele inseticida específico naquele vetor em ensaios futuros durante longos períodos de tempo, para permitir comparabilidade dos resultados. Do contrário, o método não permitirá a avaliação das alterações na resistência daquela espécie com o passar do tempo.

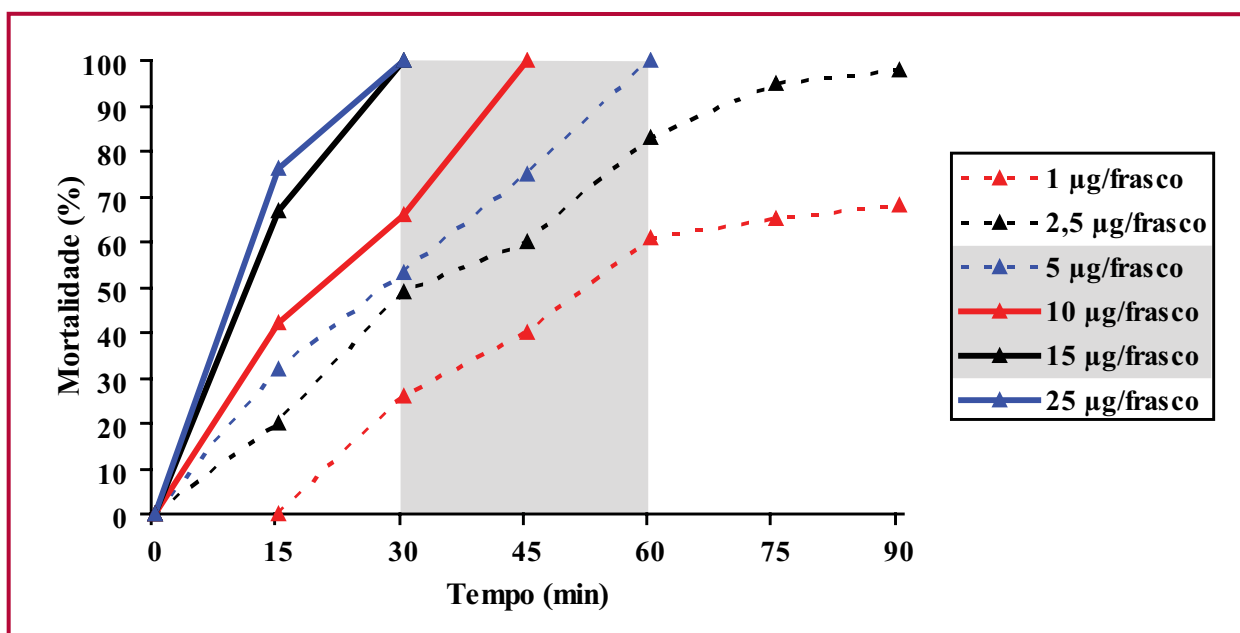


Figura: Determinação das doses diagnósticas e tempos de diagnóstico.

No exemplo ilustrado, 15 µg/frasco é o ponto de saturação porque doses mais altas não reduziram o tempo necessário para matar 100% de mosquitos suscetíveis. Uma concentração <5 µg/frasco demora mais de 60 minutos para matar 100% dos mosquitos suscetíveis, o que significa esses mosquitos demorariam um muito tempo para serem mortos por esta dose. As doses entre 5 e 15 µg/frasco (área sombreada) estão no intervalo utilizável para detectar a resistência e o tempo de diagnóstico para cada uma destas concentrações será o tempo onde 100% dos mosquitos foram mortos. Portanto, por exemplo, pode ser selecionada uma opção compreendendo uma dose diagnóstica de 10 µg/frasco e um tempo de diagnóstico de 45 minutos.

Apêndice 3. Ficha de resultados do bioensaio com garrafa do CDC

Data: _____ Espécie de mosquito: _____

Inseticida: _____

Dose diagnóstica: _____ Tempo de diagnóstico: _____

Local de coleta de mosquito: _____

Tempo (min)	Frasco 1		Frasco 2		Frasco 3		Frasco 4		Todos os frascos teste			Controle		
	Vivo	Morto	Vivo	Morto	Vivo	Morto	Vivo	Morto	Total mortos	Total	% de mortos	Total mortos	Total	% de mortos
0														
15														
30														
35														
40														
45														
60														
75														
90														
105														
120														
Total no frasco														