



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**DOUGLAS DE ALMEIDA ROCHA**

**INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS BIOLÓGICOS NA  
SUSCETIBILIDADE DE PHLEBOTOMINAE (DIPTERA:  
PSYCHODIDAE) A INSETICIDAS**

**BRASÍLIA**

**2020**

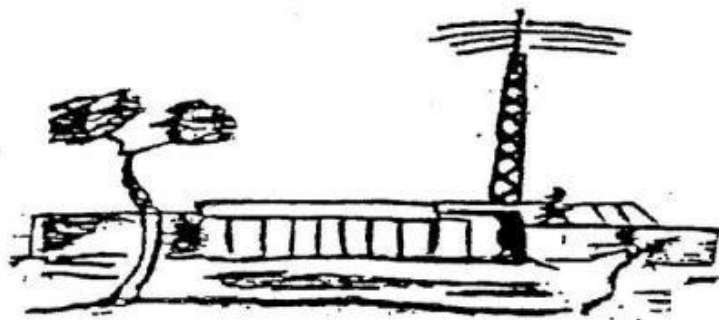
# **INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS BIOLÓGICOS NA SUSCETIBILIDADE DE PHLEBOTOMINAE (DIPTERA: PSYCHODIDAE) A INSETICIDAS**

**Douglas de Almeida Rocha**

Defesa de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília para a obtenção do título de doutor em Medicina Tropical, na área de concentração: Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Takashi Obara

Coorientadora: Profa. Dra. Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa



**Brasília**

**2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

di de Almeida Rocha, Douglas  
INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS BIOLÓGICOS NA SUSCETIBILIDADE DE  
PHLEBOTOMINAE (DIPTERA: PSYCHODIDAE) A INSETICIDAS /  
Douglas de Almeida Rocha; orientador Marcos Takashi Obara;  
co-orientador Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa. -- Brasília,  
2020.  
256 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Medicina Tropical) --  
Universidade de Brasília, 2020.

1. Medicina Tropical. 2. Leishmanioses. 3. Flebotomíneos.  
4. Controle químico. 5. Resistência a inseticida. I. Takashi  
Obara, Marcos, orient. II. Caldas D'Ávila Pessoa,  
Grasielle, co-orient. III. Título.

**INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS BIOLÓGICOS NA SUSCETIBILIDADE  
DE PHLEBOTOMINAE (DIPTERA: PSYCHODIDAE) A INSETICIDAS**

**Universidade de Brasília**

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcos Takashi Obara (Orientador)

Universidade de Brasília - UnB

Profa. Dra. Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa (Coorientadora)

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Dra. Maria de Lourdes da Graça Macoris (Titular)

Pesquisadora Científica e Consulta da FIOCRUZ

Dra. Rafaella Albuquerque e Silva (Titular)

Ministério da Saúde - MS

Prof. Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves (Titular)

Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr. Wildo Navegantes de Araújo (Suplente)

Universidade de Brasília - UnB

**Brasília**

**2020**

Não diga não à vida que te espera  
Para festejar a alegria de viver  
Para agradecer a luz do seu caminho  
E você vai com isso entender

(Roberto Gómez Bolaños)

## AGRADECIMENTOS

À Deus... “Tudo é do Pai, toda honra e toda glória, é dele a vitória, alcançada em minha vida. Tudo é do Pai, se sou fraco e pecador bem mais forte é o meu Senhor, que me cura por amor”.

À Mamãe do Céu... “Nas Ave Marias que hoje eu rezo, esqueço as palavras e adormeço. E embora cansado, sem rezar como eu devo, eu de Ti Maria não me esqueço”.

Aos amores da minha vida, Maria Flor e Ricardo. Papai ama vocês.

À minha esposa, Aline. Obrigado pela cumplicidade, companheirismo e apoio incondicional. Te amo.

À toda minha família, em especial ao meu pai, Hagamenon, minha mãe, Leide, meus irmãos Dennys e Danielle. Não consigo mensurar, nem descrever o quanto vocês são importantes para mim. Amo vocês.

Aos meus amigos que sempre torceram, comemoraram e choraram comigo esses anos todos. Obrigado.

Ao meu amigo e orientador, Prof. Marcos Takashi Obara, pela confiança, paciência, incentivo e ensinamentos nessa jornada de quase 10 anos. Muito obrigado.

À minha amiga e coorientadora, Profa. Grasielle Caldas D’Ávila Pessoa, pelo apoio em todas as etapas do projeto, conselhos, ensinamentos e principalmente pela amizade. Muito obrigado.

Ao Prof. Andrey José de Andrade, um amigo, um mestre, um exemplo de profissional e de pessoa. Muito obrigado.

Aos meus colegas do Núcleo de Medicina Tropical, que de alguma forma contribuiu na minha formação.

À Lúcia Martins, secretária do Núcleo de Medicina Tropical, pela competência e disposição em ajudar sempre que requisitada. Muito obrigado.

À equipe do Laboratório de Parasitologia e Biologia de Vetores da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, pelos mais diversos auxílios durante esses anos.

À equipe do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo, pela doação dos flebotomíneos utilizados no estudo, assim como disponibilização do laboratório.

Aos estudantes, Lidiane Medeiros da Costa, Rosilene Moreira Ribeiro e Artur Metzker Serravite da Universidade Federal de Minas Gerais pelo apoio na realização de ensaios biológicos com flebotomíneos.

À equipe do Centro de Controle de Zoonoses de Montes Claros, Minas Gerais, pelo apoio na captura e disponibilização do laboratório para realização dos bioensaios, em especial à Marília Rocha e ao Ronaldo Santos.

À equipe do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, em especial do Dr. Fernando Genta e ao Dr. Bruno Gomes, pela doação dos flebotomíneos utilizados no estudo, assim como disponibilização do laboratório.

Ao Fabrício da Silva Morgado, pelo auxílio nos testes estatísticos.

À Katlen Alves Soares e Michelle Soares da Biblioteca Central da Universidade de Brasília, pelo auxílio na comutação de estudos científicos.

À Alexandra Elbakyan, fundadora do site Sci-Hub, por fazer ciência. E mais do que isso, proporcionar que outros a façam por meio de acesso a conteúdos científicos.

À Banca Examinadora, pela disponibilidade e contribuições para aperfeiçoamento deste estudo.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, pelo apoio institucional e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e à Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal – FAP - DF pelo apoio financeiro.

A todos aqueles, que direta ou indiretamente me apoiaram durante esta jornada.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar. A e B: Leishmaniose cutânea; C: Leishmaniose mucocutânea; D: Leishmaniose difusa. 21
- Figura 2.** Manifestação clínica da leishmaniose visceral. 21
- Figura 3.** Estimativa e distribuição do número de casos novos de leishmaniose tegumentar no mundo, em 2018. 22
- Figura 4.** Estimativa e distribuição do número de casos novos de leishmaniose visceral no mundo, em 2018. 23
- Figura 5.** Estimativa e distribuição do número de casos novos de leishmaniose tegumentar no Brasil, em 2017. 24
- Figura 6.** Estimativas e distribuição do número de casos novos de leishmaniose visceral no Brasil, em 2017. 24
- Figura 7.** Estágios do ciclo de vida dos flebotomíneos. 26
- Figura 8.** Estratégia de busca dos estudos de resistência de flebotomíneos a inseticidas em quatro bases de dados de referências científicas da área biomédica. 40
- Figura 9.** Bioensaio de garrafa do CDC para avaliação da suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas. A: Garrafa Wheaton para avaliação do bioensaio; B: Flebotomíneos na garrafa durante a avaliação de suscetibilidade; C: Avaliação de mortalidade dos flebotomíneos no bioensaio de garrafa. 43

**Figura 10.** Bioensaio de cones para avaliação da 44 suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas. A: Fixação dos papéis impregnados; B: Fixação dos cones; C: Flebotomíneos no bioensaio de cones durante a avaliação de suscetibilidade.

**Figura 11.** Esquema organizacional dos bioensaios de garrafa 46 e cone com a espécie *Lu. longipalpis* expostas a 3 µg/mL de alfacipermetrina.

**Figura 12.** Avaliação da alimentação dos flebotomíneos em 49 fontes sanguíneas e açucaradas após exposição à alfacipermetrina a 3 µg/mL e acetona com a metodologia de garrafa.

**Figura 13.** Fluxograma de inclusão e exclusão de estudos a 51 respeito dos bioensaios de laboratório de suscetibilidade/resistência de flebotomíneos.

**Figura 14.** Populações de flebotomíneos resistentes para 72 diferentes classes de inseticidas.

**Figura 15.** Populações de flebotomíneos tolerantes para 72 diferentes classes de inseticidas.

**Figura 16.** Curvas de sobrevivência, de Kaplan-Meyer, da 110 espécie *Lu. longipalpis* submetidas ao bioensaio de garrafas, conforme dieta ao inseticida alfacipermetrina a 3 µg/mL.

**Figura 17.** Curvas de sobrevivência, de Kaplan-Meyer, da 111 espécie *Lu. longipalpis* submetidas ao bioensaio de garrafas, conforme sexo ao inseticida alfacipermetrina a 3 µg/mL.

**Figura 18.** Curvas de sobrevivência, de Kaplan-Meyer, da 111  
espécie *Lu. longipalpis* submetidas ao bioensaio de garrafas,  
conforme idade ao inseticida alfacipermetrina a 3 µg/mL.

**Figura 19.** Curvas de sobrevivência, de Kaplan-Meyer, da 112  
espécie *Lu. longipalpis* submetidas ao bioensaio de cones,  
conforme dieta ao inseticida alfacipermetrina a 3 µg/mL.

**Figura 20.** Curvas de sobrevivência, de Kaplan-Meyer, da 113  
espécie *Lu. longipalpis* submetidas ao bioensaio de cones,  
conforme sexo ao inseticida alfacipermetrina a 3 µg/mL.

**Figura 21.** Curvas de sobrevivência, de Kaplan-Meyer, da 113  
espécie *Lu. longipalpis* submetidas ao bioensaio de cones,  
conforme idade ao inseticida alfacipermetrina a 3 µg/mL.

**Figura 22.** Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier das 114  
populações de flebotomíneos de Jacobina, Teresina e Montes  
Claros com a metodologia de garrafas.

**Figura 23.** Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier das 115  
populações de flebotomíneos de Jacobina, Teresina e Montes  
Claros com a metodologia de cones.

**Figura 24.** Análise de diluentes, com a metodologia de 117  
garrafas, na avaliação da mortalidade de flebotomíneos.

**Figura 25.** Avaliação da perda de pernas dos flebotomíneos 119  
por meio da avaliação do piretróide alfacipermetrina e do  
carbamato bendiocarb nos métodos de garrafas e cones.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Principais características dos estudos de suscetibilidade e resistência de flebotomíneos a inseticidas. 53
- Tabela 2.** Colônias de flebotomíneos com potencial para Linhagem Referência de Suscetibilidade. 74
- Tabela 3.** Doses letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécie e inseticida. 78
- Tabela 4.** Tempos letais e diagnósticos encontrados nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécies e inseticida. 90
- Tabela 5.** Estimativas de TL<sub>50</sub>, TL<sub>90</sub> e TL<sub>95</sub> para as populações de flebotomíneos de Jacobina, Teresina e Montes Claros com a metodologia de garrafas e cones. 116
- Tabela 6.** Mortalidade dos flebotomíneos de acordo com dois critérios de mortalidade, expostos a 3 µg/mL de alfacipermetrina na metodologia de garrafas. 118
- Tabela 7.** Impacto da perda de pernas dos flebotomíneos na alimentação após exposição à alfacipermetrina a 3 µg/mL e acetona com a metodologia de garrafa. 120

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Microgramas
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
cm	Centímetros
DDT	Dietildicloro difeniltricloroetano
DD	Dose Diagnóstica
DL	Dose Letal
KM	Kaplan-Meier
LRS	Linhagem Referência de Suscetibilidade
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
Lu	<i>Lutzomyia</i>
LV	Leishmaniose Visceral
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
mg	Miligramas
mL	Mililitros
NI	Não identificado
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
PA	Para análise
Ph	<i>Phlebotomus</i>
RR	Razão de Resistência
Se	<i>Sergentomyia</i>
TD	Tempo Diagnóstico
TL	Tempo Letal
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UR	Umidade Relativa

## **ORGÃOS FINANCIADORES**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAP – DF)

## ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Leishmanioses	21
1.2	Flebotomíneos	26
1.3	Aspectos de prevenção e controle das leishmanioses	28
1.4	Controle químico dos vetores de LV	31
1.5	Resistência de flebotomíneos a inseticidas	32
1.6	Bioensaios para estudo da resistência em flebotomíneos	34
2	JUSTIFICATIVA	37
3	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo geral	39
3.2	Objetivos específicos	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	Revisão sistemática de bioensaios para detecção de resistência de flebotomíneos a inseticidas	40
4.2	Material biológico	42
4.3	Inseticidas e diluentes	43
4.4	Metodologias de avaliação de suscetibilidade	43
4.5	Análise dos parâmetros biológicos, idade, sexo e estado nutricional	46
4.6	Comparação de populações para indicação de Linhagem Referência de Suscetibilidade	47
4.7	Análise dos parâmetros metodológicos, diluentes e critério de mortalidade	48
4.8	Análise da perda de pernas dos flebotomíneos à exposição de inseticidas	48
4.9	Análise estatística	50
5	RESULTADOS	51

5.1	Revisão sistemática de bioensaios para detecção de resistência de flebotomíneos a inseticidas	51
5.2	Avaliação do impacto das variáveis biológicas e metodológica na suscetibilidade do flebotomíneo <i>Lu. longipalpis</i> ao inseticida alfacipermetrina	111
5.3	Determinação de Linhagem Referência de Suscetibilidade	115
5.4	Análise dos parâmetros metodológicos	118
5.4.1	Diluentes	118
5.4.2	Análise dos critérios de mortalidade na suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas	119
5.5	Análise da perda de pernas dos flebotomíneos na suscetibilidade a inseticida	119
6	DISCUSSÃO	122
7	CONCLUSÕES	132
8	REFERÊNCIAS	134
9	ANEXO I	150
10	ANEXO II	230
11	ANEXO III	246



## RESUMO

ROCHA, Douglas A. Influência de parâmetros biológicos na suscetibilidade de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) a inseticidas. Tese (Doutorado em Biologia) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

Introdução: A classificação de populações de flebotomíneos resistentes a inseticidas é baseada em conceitos e metodologias utilizadas para caracterização do perfil de suscetibilidade em mosquitos. Entretanto, flebotomíneos são insetos com biologia distinta o que poderia levar a interpretações errôneas e subjetivas na classificação de uma população a inseticidas. Objetivo: Avaliar o impacto das variáveis biológicas na suscetibilidade do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* ao inseticida alfacipermetrina, assim como identificar e descrever os relatos de resistência de flebotomíneos aos inseticidas no mundo e sugerir uma população de referência para futuros ensaios biológicos. Metodologia: Flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis* foram avaliados, em relação ao sexo, idade, estado nutricional, critério de mortalidade e efeito sub-letal nas metodologias de garrafas do CDC e de cones modificados da OMS para os inseticidas alfacipermetrina e bendiocarb e os diluentes álcool e acetona. Ademais, 61 estudos, obtidos de forma sistemática em quatro bases de dados científicas, foram incluídos para avaliação. Além disso, três populações de flebotomíneos foram analisadas quanto a designação de uma população de referência. Resultados: As curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier demonstraram diferença estatística na dieta de flebotomíneos, na metodologia de garrafas, onde as fêmeas alimentadas com sangue foram mais suscetíveis, quando comparadas às fêmeas alimentadas apenas com solução açucarada usando a método de garrafa ( $p = 0,001$ ) e na idade, na metodologia de cones modificados, no qual os flebotomíneos com cinco dias de idade foram mais suscetíveis do que os flebotomíneos com três dias ( $p = 0,001$ ). O sexo e os diluentes álcool e acetona não influenciaram os resultados dos ensaios biológicos. Registros de resistência de flebotomíneos estão descritos para

todas as classes de inseticidas, principalmente para as espécies *Phlebotomus papatasi* e *Ph. argentipes*, oriundas do Velho Mundo. No entanto, apenas dois trabalhos realizaram comparações entre os flebotomíneos de campo e flebotomíneos mantidos em laboratório (controle) e as doses e tempos letais de flebotomíneos são muito variadas, revelando que não existe um protocolo específico de avaliação de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas. Conclusões: Conclui-se que a suscetibilidade dos flebotomíneos a inseticida é influenciada pela idade e pelo estado nutricional. Porém, o sexo dos insetos não demonstra impactar nas análises. Atualmente, há 47 populações de Phlebotominae com resistência confirmada para um ou mais inseticidas e outras 28 populações consideradas tolerantes. Além disso, a população de *Lu. longipalpis* oriunda de Jacobina e criada na Fiocruz do Rio de Janeiro, aqui é sugerida como Linhagem Referência de Suscetibilidade brasileira.

Palavras-chave: Flebotomíneo, Leishmaniose, Controle de Vetores, Bioensaio, Resistência a inseticidas.

## ABSTRACT

ROCHA, Douglas A. Influence of biological parameters on the susceptibility of Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) to insecticides. Thesis (Doctoral Degree in Tropical Medicine, Concentration Area in Biology of Infectious and Parasitic Diseases) – Postgraduate Program in Tropical Medicine, University of Brasilia, Brasília, 2020.

Introduction: The classification of insecticide-resistant sandfly populations is based on concepts and methodologies used to characterize the susceptibility profile in mosquitoes. However, sandflies are insects with distinct biology which could lead to erroneous and subjective interpretations in classifying a population to insecticides. Objective: To evaluate the impact of biological variables on the susceptibility of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* to the alpha-pipermethrin insecticide, as well as to identify and describe the reports of sandfly resistance to insecticides in the world and suggest a reference population for future biological tests. Methodology: *Lu. longipalpis* species were evaluated in relation to sex, age, nutritional status, mortality criteria and sub-lethal effect in the methodologies of CDC bottles and modified WHO cones for the insecticides alpha-cypermethrin and bendiocarb and the diluents alcohol and acetone. In addition, 61 studies, obtained systematically from four scientific databases, were included for evaluation. In addition, three sandfly populations were analyzed for the designation of a reference population. Results: The Kaplan-Meier survival curves showed a statistical difference in the diet of sandflies, in the bottle methodology, where females fed with blood were more susceptible when compared to females fed only with sugary solution using the bottle method ( $p = 0.001$ ) and age, in the modified cone methodology, in which five-day-old sandflies were more susceptible than three-day-old sandflies ( $p = 0.001$ ). Gender, alcohol and acetone did not influence the results of biological tests. Records of phlebotomine resistance are described for all classes of insecticides, mainly for the species *Phlebotomus papatasi* and *Ph. argentipes*, from the Old World. However, only two studies carried out comparisons between field phlebotomines and

phlebotomines kept in the laboratory (control) and the phlebotomine doses and lethal times are very varied, revealing that there is no specific protocol for assessing the phlebotomine susceptibility to insecticides. Conclusions: It is concluded that the susceptibility of sandflies to insecticide is influenced by age and nutritional status. However, the sex of insects does not seem to impact the analysis. Currently, there are 47 populations of Phlebotominae with confirmed resistance to one or more insecticides and another 28 populations considered tolerant. In addition, the population of *Lu. longipalpis* originating from Jacobina and created at Fiocruz in Rio de Janeiro, here it is suggested as a Brazilian Susceptibility Reference Lineage.

Keywords: Sandfly, Leishmaniasis, Vector Control, Bioassay, Insecticide resistance.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecciosas parasitárias, consideradas zoonoses, que pode se manifestar no homem quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do agente infeccioso causador dessas enfermidades. Esta doença acomete pele, mucosas e/ou vísceras dependendo, principalmente, da espécie ou cepa do protozoário, assim como do estado imunológico do hospedeiro. Os parasitos causadores das leishmanioses são protozoários flagelados do gênero *Leishmania* Ross 1903, os quais apresentam ciclo de vida heteróximo, vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados (mamíferos e répteis) e flebotomíneos, estes últimos, responsáveis pela transmissão de *Leishmania* (Lainson & Shaw 1973). O gênero *Leishmania* pertence à ordem Euglenozoa família Trypanosomatidae (Cavalier-Smith 2016). Os protozoários deste gênero apresentam duas formas morfológicas básicas: i) promastigota – forma flagelada encontrada no intestino dos flebotomíneos vetores e ii) amastigota – forma circular e parasita intracelular obrigatória de células do sistema monocítico fagocitário (Killick-Kendrick 1979).

As leishmanioses apresentam duas formas clínicas clássicas, denominadas de tegumentar ou cutânea e visceral. A leishmaniose tegumentar (LT) caracteriza-se por feridas na pele que se localizam com maior frequência nas partes descobertas do corpo. Tardamente, pode haver ulceração nas mucosas do nariz, da boca e da garganta, caracterizando-a como cutaneomucosa. Existe também uma forma rara de LT, a leishmaniose cutânea difusa, a qual se caracteriza por comprometimento dérmico maciço de natureza crônica e com recidivas frequentes (Figura 1). A leishmaniose visceral (LV) é uma doença sistêmica, que acomete vários órgãos internos, mas principalmente o fígado, o baço e a medula óssea (Figura 2). Esse tipo de leishmaniose manifesta-se principalmente em crianças de até 10 anos;

após esta idade se torna menos frequente. É caracterizada por febre de longa duração, perda de peso, astenia, adinamia e anemia, dentre outras manifestações. Quando não tratada, pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos (Brasil 2014, Brasil 2017).

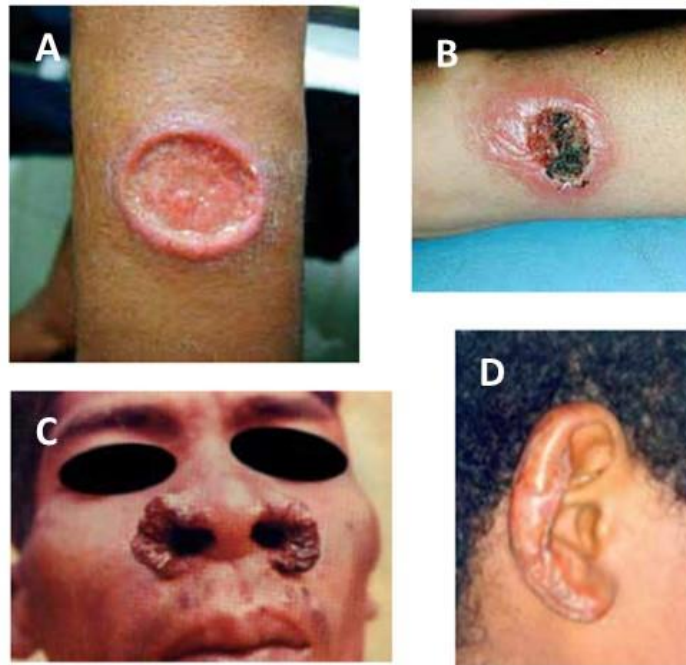


Figura 1. Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar. A e B: Leishmaniose cutânea; C: Leishmaniose mucocutânea; D: Leishmaniose difusa. Fonte: Ministério da Saúde (2017).



Figura 2. Manifestação clínica da leishmaniose visceral. Fonte: Ministério da Saúde (2014).

A transmissão de *Leishmania* ocorre, principalmente por meio da picada de fêmeas de flebotomíneos (Diptera: Phlebotominae) infectadas. Porém, transmissões congênita, sexual (Turchetti et al. 2014), por transfusões de sangue (Dey & Singh 2006), compartilhamento de agulhas entre usuários de drogas (Alvar et al. 2008), por potenciais vetores como carrapatos (Dantas-Torres 2011) e dípteros ceratopogonídeos (Diptera: Ceratopogonidae) (Dougall et al. 2011) também são registrados na literatura.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que nos últimos cinco anos, mais de um milhão de pessoas contraíram LT em todo o mundo. Em 2018, países como Brasil, Colômbia, Afeganistão, Sudão e Argélia registraram mais de 5 mil casos novos da doença (Figura 3). Já as estimativas anuais para a LV são de 300 mil casos e 20 mil mortes. Os países mais acometidos em 2018, foram Brasil, Bangladesh, Índia e Etiópia (Figura 4) (OMS 2020).

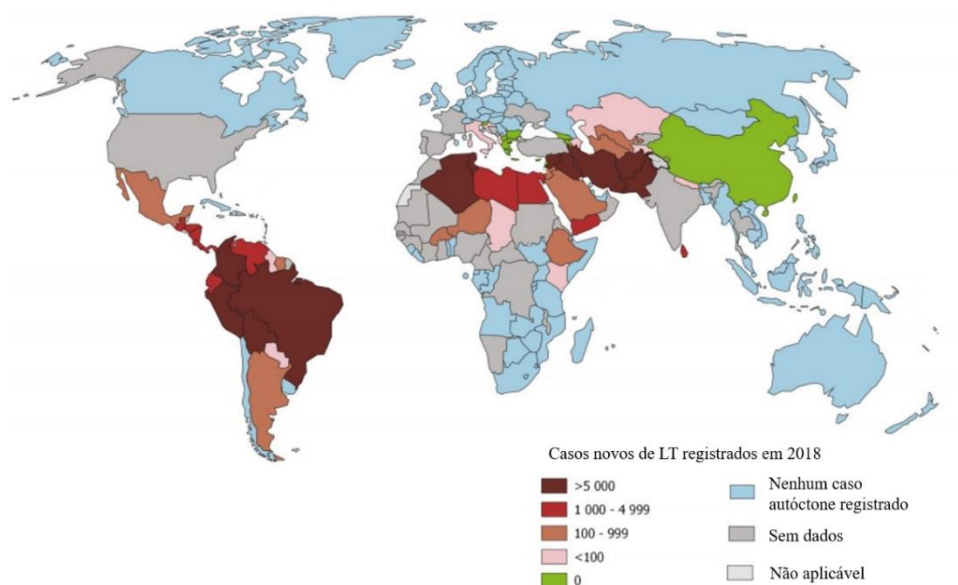


Figura 3. Estimativa e distribuição do número de casos novos de leishmaniose tegumentar no mundo, em 2018. Fonte: Adaptado de OMS (2020).

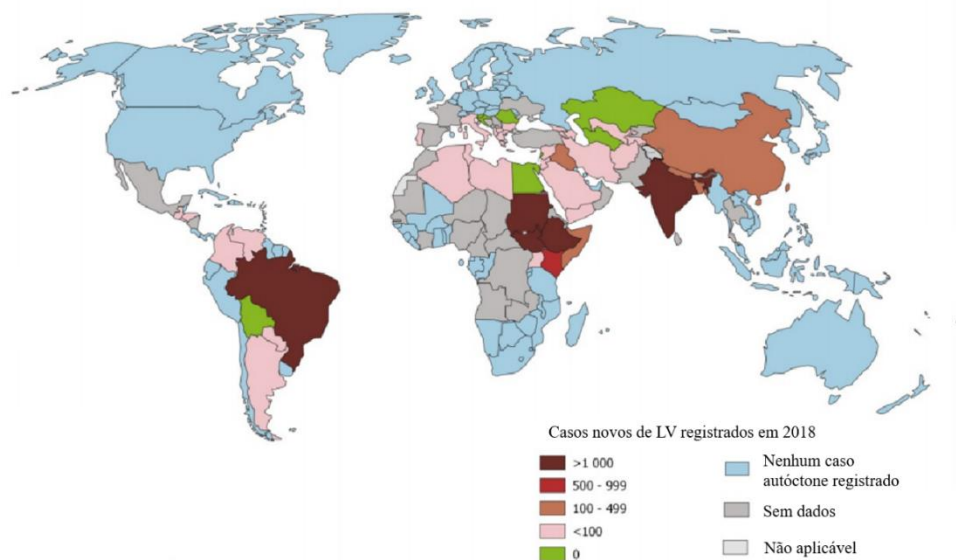


Figura 4. Estimativa e distribuição do número de casos novos de leishmaniose visceral no mundo, em 2018. Fonte: Adaptado de OMS (2020).

No Brasil, a LV está presente em todas as unidades federativas, onde são registrados cerca de 21 mil casos/ano. A região Norte apresenta o maior coeficiente de incidência (46,4 casos/100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (17,2 casos/100.000 habitantes) e Nordeste (8 casos/100.000 habitantes) (Figura 5) (Brasil 2020a).

A LV, no Brasil, vem apresentando anualmente cerca de 3.500 casos. Além disso, a letalidade vem aumentando gradativamente, passando de 3,2% em 2000 para 8,9% em 2018. As regiões mais acometidas pela LV são a Norte e a Nordeste, onde o coeficiente de incidência (por 100 mil habitantes) foi de 4,05% e 3,06%, respectivamente, em 2018 (Figura 6) (Brasil 2020b).



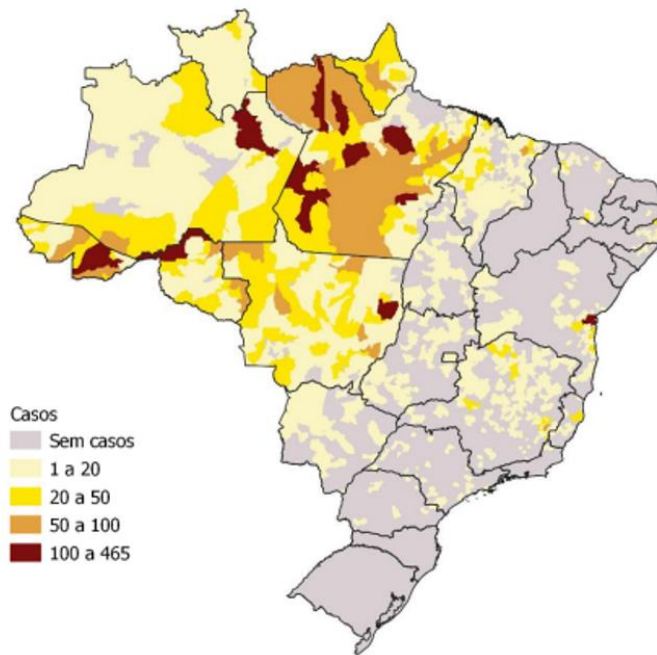


Figura 5. Estimativa e distribuição do número de casos novos de leishmaniose tegumentar no Brasil, em 2017. Fonte: Ministério da Saúde (2020a).

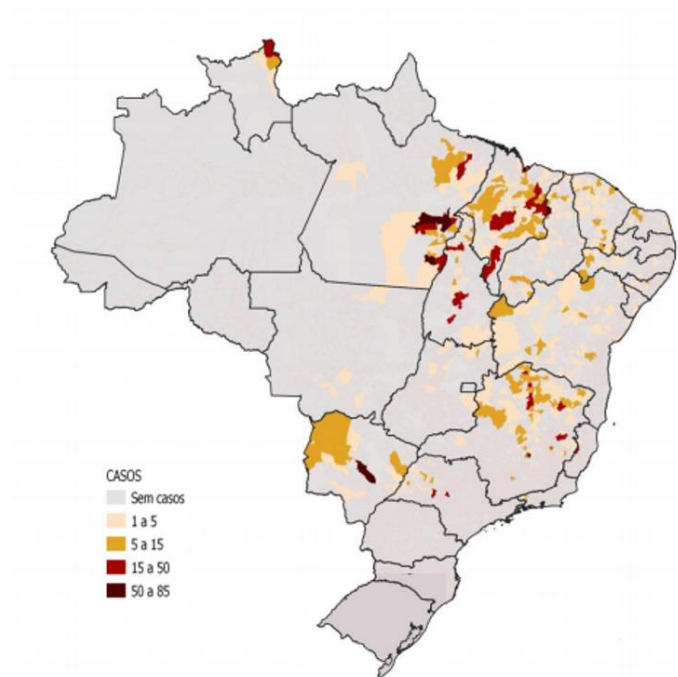


Figura 6. Estimativas e distribuição do número de casos novos de leishmaniose visceral no Brasil, em 2017. Fonte: Ministério da Saúde (2020b).

## 1.2 Flebotomíneos

Os flebotomíneos são pequenos dípteros hematófagos da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Segundo a classificação de Young & Duncan (1994), o gênero *Lutzomyia* compreende os vetores comprovados e suspeitos pela transmissão de *Leishmania* nas Américas. Já a proposta de classificação mais recente, com abordagem filogenética (Galati 1995, 2003), o gênero *Lutzomyia* estaria dividido em 19 subgêneros dos quais algumas espécies estariam envolvidas na epidemiologia das leishmanioses.

Há uma estimativa de que 48 espécies de flebotomíneos estejam implicadas na transmissão de *Leishmania* no Novo Mundo e outras 38 espécies sejam suspeitas. No Brasil, esses números são de 17 espécies incriminadas e 13 suspeitas (Maroli et al. 2013). Dentre os flebotomíneos comprovadamente vetores da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) destacam-se *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia whitmani*, *Ny. intermedia* e *Bichromomyia flaviscutellata* que estão presentes em grande parte do território nacional, enquanto *Ny. umbratilis* e *Psychodopygus wellcomei*, se fazem presentes na metade norte do Brasil. Em relação aos flebotomíneos responsáveis pela transmissão da LV, *Lu. longipalpis*, *Lu. cruzi* são as únicas incriminadas, tendo a primeira ampla distribuição no país e o segunda restrita à algumas localidades na região centro-oeste (Ready 2013).

Como todo inseto pertencente à ordem Diptera, os flebotomíneos, são holometábolos, passam pelas fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto (Figura 7). O ciclo de vida completo, em condições de laboratório, dura em média 30 dias, podendo variar de acordo com a temperatura do ambiente e a alimentação dos insetos (Rangel et al. 1987). As formas imaturas possuem habitat terrestre, desenvolvendo-se em locais úmidos, sombreados e ricos em matéria orgânica em decomposição, especialmente de natureza vegetal. Os adultos são amarelados ou castanhos, com cerca de 2,5 mm de comprimento, possuem voo saltado e quando em repouso mantêm as asas eretas. A superfície corporal apresenta um revestimento quitinoso delgado, necessitando assim, abrigar-se em locais onde possam proteger-se de

mudanças de temperatura e pluviosidade que ocorrem no ambiente (Aguiar & Medeiros 2003). Os flebotomíneos adultos apresentam dimorfismo sexual baseado nos últimos segmentos abdominais. Os machos apresentam no final do abdome a genitália, formada por três pares de apêndices em forma de ganchos, enquanto o final do abdome das fêmeas é rombo e sua genitália é internalizada (Young & Duncan 1994).

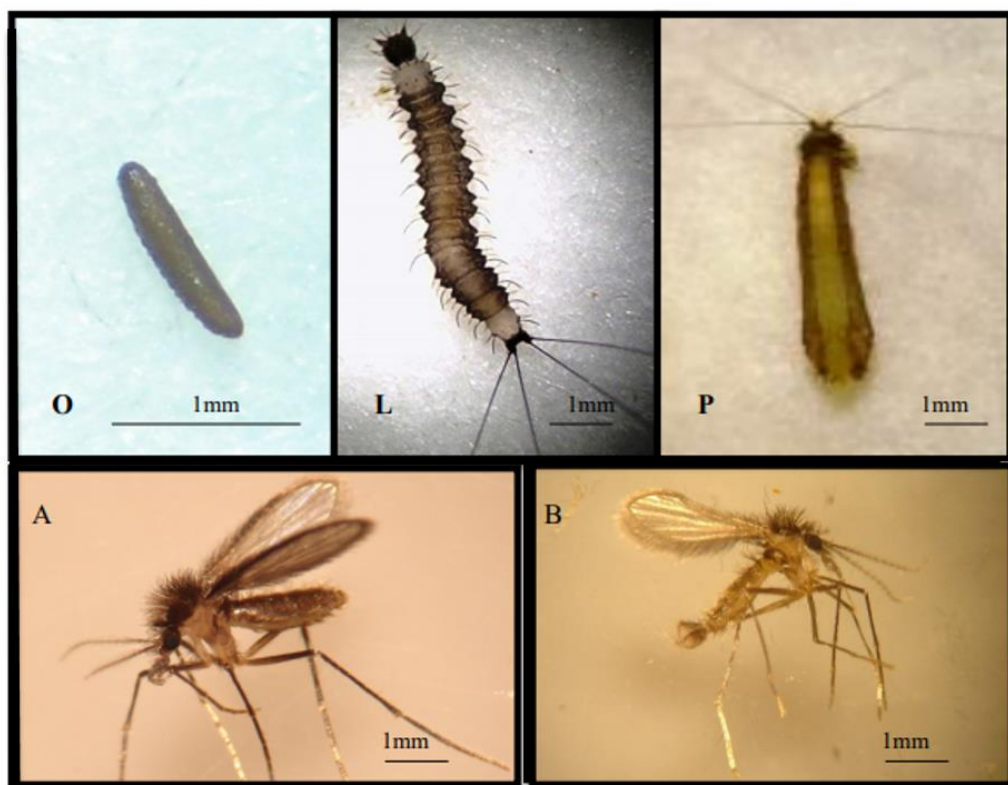


Figura 7. Estágios do ciclo de vida dos flebotomíneos.

O - ovo; L - larva; P – pupa; A – adulto fêmea; B – adulto macho. Fotos: Thiago Vasconcelos dos Santos

Distribuem-se por quase todas as regiões do mundo, sendo mais diversos na Região Neotropical, com maior número de espécies e densidade que flutuam de acordo com a estação climática (Sherlock 2003). Em todo o mundo são conhecidas 1008 espécies, das quais, mais de 542 estão presentes na região Neotropical e destas, 281 foram registradas no Brasil,

representando 27% do total e 52% das que ocorrem na Região Neotropical (Shimabukuro et al. 2017, Galati, 2019).

No período crepuscular os flebotomíneos iniciam suas atividades. Ambos os sexos se alimentam de sucos vegetais, néctar de flores, frutos e soluções açucaradas. No entanto, as fêmeas, necessitam de uma alimentação sanguínea para a maturação dos ovos. Por meio deste hábito, os flebotomíneos podem se infectar e/ou transmitir *Leishmania* para hospedeiros vertebrados (Killick-Kendrick 1990).

### **1.3 Aspectos gerais de prevenção e controle das leishmanioses**

Com o contínuo aumento das infecções das leishmanioses, o controle destas enfermidades requer a adoção de diferentes estratégias como medidas preventivas e de controle para a interrupção da transmissão humana. Dentre as ações de prevenção podemos citar a: i) educação em saúde, ii) mosquiteiros, iii) telagem de portas e janelas e iv) manejo ambiental. Já as medidas de controle se dão com o uso de substâncias químicas, comumente denominadas de inseticidas, seja eles aplicados nas paredes, em criadouros de animais ou impregnados em mosquiteiros e coleiras de cachorro (Brasil 2014).

Um elemento central na implementação de qualquer método de prevenção e controle de doenças é a educação em saúde (OMS 2010). Segundo Killick-Kendrick (2010), esta é a chave para controlar a LV. As atividades de educação em saúde são recomendadas pelos manuais de LV e LT do Ministério da Saúde brasileiro, devendo-se inseri-las em todos os serviços que desenvolvem as ações de controle das leishmanioses, requerendo o envolvimento efetivo das equipes multiprofissionais e multi-institucionais com vistas ao trabalho articulado nas diferentes unidades de prestação de serviços (Brasil 2014, 2017).

O mosquiteiro tratado com inseticida é um método eficiente e sustentável para controle de doenças transmitidas por flebotomíneos e mosquitos. Alexander & Maroli (2003) sugeriram que mosquiteiros

impregnados com inseticida poderiam ser uma forma mais eficiente e barata, em comparação com a borrifação intradomiciliar para controle de flebotomíneos. Em estudos realizados por Courtenay et al. (2007), na Ilha de Marajó, Pará, demonstrou-se que os mosquiteiros impregnados aumentaram o efeito de barreira das redes em 39%, reduzindo o contato dos flebotomíneos com os homens em 80% e aumentando a taxa de mortalidade dos insetos em 98% em comparação com redes não tratadas. Na Índia, Dinesh et al. (2008) não encontraram diferenças significativas nos bioensaios com redes impregnadas com o inseticida permetrina e mosquiteiros sem inseticida para controle de *Phlebotomus argentipes* ( $p = 0,61$ ). Bray & Hamilton (2013) avaliaram a efetividade de mosquiteiros impregnados com lambda-cialotrina no controle de *Lu. longipalpis*, em condições de laboratório. O efeito letal do tratamento foi de  $56\% \pm 3,9$  após a aplicação para  $10,0\% \pm 2,1$  após seis meses de impregnação. Apesar dos bons resultados alcançados no controle dos flebotomíneos, os autores sugerem que testes em condições de campo sejam realizados, principalmente em galinheiros e outros abrigos de animais.

Alterações ambientais, sejam por meio de fenômenos naturais ou pela intervenção humana (manejo ambiental), alteram o equilíbrio ecológico e o contexto dentro dos quais vetores e parasitos se desenvolvem e podem causar doenças aos seres humanos (Pessoa et al. 2007). O manejo ambiental é uma medida de controle que tem como objetivo tornar o ambiente inadequado ao vetor. Medidas simples como limpeza de quintais e terrenos públicos, eliminação dos resíduos orgânicos e destino adequado dos mesmos, eliminação de fonte de umidade e cuidados com animais domésticos, entre outras, contribuem para evitar ou reduzir a proliferação não só dos vetores das leishmanioses, mas de outros insetos de importância médica (Brasil 2012).

O uso de coleira impregnada com inseticida é uma ferramenta utilizada no controle da leishmaniose visceral canina, uma vez que apresenta atividade inseticida e repelente, diminuindo o contato dos flebotomíneos com os cães. Essa ferramenta pode auxiliar o programa de controle das leishmanioses,

principalmente nas medidas direcionadas aos reservatórios domésticos (Silva et al. 2018).

Killick-Kendrick et al. (1997) avaliaram a repelência e o potencial inseticida de coleiras impregnadas com deltametrina, em condições de laboratório, contra flebotomíneos da espécie *Ph. perniciosus*. Os cães encoleirados foram acompanhados durante oito meses, sendo expostos a 200 flebotomíneos por duas horas em sete momentos distintos. Segundo os autores, o encoleiramento impediu a alimentação de 96% dos flebotomíneos testados durante o estudo.

Na Itália, 120 cães saudáveis foram acompanhados por dois anos em um estudo de coorte que demonstrou taxa de proteção de 72,3% e 45,1%, no primeiro e segundo ano, respectivamente. Além disso, a taxa de proteção cumulativa foi de 50,8%. Esse valor foi considerado positivo, uma vez que estes cães, conviviam com diversos cães infectados por *Leishmania* (Foglia-Manzillo et al. 2006). Silva et al. (2018) demonstraram que o uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% foi associado a redução de 15% ( $p = 0,004$ ) e 60% ( $p < 0,001$ ) no número de flebotomíneos capturados em Montes Claros e Fortaleza, respectivamente. Além disso, observou-se diminuição de 21% captura de *Lu. longipalpis* (Razão da taxa de incidência (RTI) = 0,783;  $p < 0,001$ ) em ambiente peridomiciliar, em Montes Claros. Em Fortaleza, houve diminuição de 56% (RTI = 0,44;  $p < 0,001$ ) e 60% (TIR = 0,40;  $p < 0,001$ ) na captura de *Lu. longipalpis* no intra e peridomicílio, respectivamente.

No entanto, essas estratégias têm se mostrado pouco efetivas no controle das leishmanioses, não conseguindo reduzir o contato dos flebotomíneos com os homens (Alexander & Maroli 2003). Deste modo, órgãos como a OMS e o Ministério da Saúde do Brasil, recomendam a adoção do controle químico dos vetores, por meio de inseticidas de ação residual. Essa medida é tomada quando há registro do primeiro caso autóctone humano de LV e/ou em locais com transmissão moderada e intensa (Brasil 2014).

#### 1.4 Controle químico dos vetores de LV

As primeiras tentativas de controle químico de flebotomíneos, no Brasil, ocorreram durante uma campanha no ano de 1953, no Ceará, por meio de pulverização residual com o inseticida organoclorado dietildicloro difeniltricloroetano (DDT). O número de flebotomíneos e a taxa de incidência da doença na região permaneceram baixas durante cinco anos (Monteiro et al. 1994).

Em 1954, Nery-Guimarães e Bustamante relataram o sucesso no controle de flebotomíneos após aplicação do DDT em um foco de LV, no estado do Rio de Janeiro. Este mesmo inseticida também foi usado com sucesso nas ações de controle da espécie *Lu. longipalpis* nos estados do Ceará e Minas Gerais nas décadas de 1950 e 1960 (Oliveira-Filho & Melo, 1994).

Em 1963, Falcão avaliou a suscetibilidade de *Lu. longipalpis* de campo contra os inseticidas DDT e dieldrin, no estado de Minas Gerais. Esse foi o primeiro estudo de avaliação de suscetibilidade de flebotomíneos no país. Até o ano do estudo, o controle químico se mostrava bastante eficiente, assim o autor decidiu analisar como os flebotomíneos se comportavam frente aos inseticidas residuais utilizados naquele momento. Como esperado, os testes demonstraram suscetibilidade da população de *Lu. longipalpis* (Falcão 1963).

No entanto, devido aos diversos questionamentos, tais como: elevada toxicidade para o ser humano e animais domésticos, custo operacional relativamente alto, necessidade de replicações frequentes e sua inativação pelo barro das paredes, o DDT foi, gradativamente, sendo substituído pelo uso dos piretróides, desde o fim dos anos 1980 e início da década de 1990 (Oliveira-Filho & Melo 1994).

Um dos primeiros trabalhos analisando os efeitos de piretróides na mortalidade de flebotomíneos ocorreu em 1988, em Minas Gerais. Neste estudo foi testado o inseticida deltametrina, em condição de laboratório, contra populações de *Lu. longipalpis* oriundos da gruta da Lapinha. Os resultados encontrados mostraram eficiência deste piretróide (Falcão et al. 1988).

Em municípios do interior da Paraíba, Marcondes & Nascimento (1993) e De Silans et al. (1998) analisaram os efeitos de deltametrina e cipermetrina, respectivamente. Ambos, avaliaram o número de flebotomíneos coletados após a borrifação de paredes com os piretróides. No primeiro estudo, as capturas apresentaram irregularidades e registro de proteção de apenas quatro semanas. No segundo estudo, os resultados mostraram que o inseticida reduziu significativamente as populações de *Lu. longipalpis*.

Em um estudo realizado no município de Montes Claros, Minas Gerais, no ano de 2011, se observou redução significativa das populações de *Lu. longipalpis* após as primeiras borrifações de do inseticida piretróide cipermetrina (Barata et al. 2011).

Atualmente, para o controle de flebotomos em áreas de transmissão da LV e da LT, o Ministério da Saúde recomenda a pulverização domiciliar de 40 mg/m<sup>2</sup> de alfacipermetrina, em dois ciclos distintos de pulverização intervalados por 120 dias, após o período chuvoso. Paredes internas e externas de domicílios, abrigos de animais e anexos, que tenham paredes e teto, devem ser borrifados (Brasil 2014, 2017).

No Brasil, as ações de prevenção e controle são descontínuas por diversas razões, tais como problemas orçamentários, falta de políticas públicas de saúde e escassez e/ou rotatividade de recursos humanos capacitados, permitindo o aparecimento de novas infecções humanas e caninas (Gontijo & Melo 2004, Romero & Boelaert 2010). Além disso, torna-se fundamental o monitoramento sistemático e periódico de resistência de flebotomíneos aos inseticidas utilizados no seu controle, a fim de subsidiar o manejo de inseticidas nos programas de controle das leishmanioses.

### **1.5 Resistência de flebotomíneos a inseticidas**

De acordo com a OMS, a resistência a inseticida é uma característica herdável, portanto genética, que confere um aumento na tolerância a um pesticida, ou grupo de pesticidas, de modo que os indivíduos sobrevivem à concentração do(s) componente(s) que seria normalmente letal para a maioria



dos indivíduos de uma população da mesma espécie (suscetível) (OMS 1957, 1992).

Os primeiros registros de resistência de flebotomíneos ocorreram na Índia. O primeiro foi em 1978, com a espécie *Ph. papatasi* – principal espécie vetora de *Leishmania major* no Velho Mundo. Populações silvestres desta espécie foram expostas a DDT a 4% por 24 horas utilizando-se kits de papéis impregnados da OMS, a qual 21% dos flebotomíneos permaneceram vivos (Kaul et al. 1978). O segundo foi registrado por Rahman et al. (1982), com a mesma metodologia, quando estudaram uma população de *Ph. papatasi* e verificaram taxa de mortalidade de 53% após uma hora de exposição a DDT 4%. Ainda no país, Singh & Bansal (1996) avaliaram a suscetibilidade de *Ph. papatasi* aos inseticidas DDT, dieldrin, malation, fenitrothion e propoxur, com o kit de papéis impregnados da OMS. A mortalidade dessa espécie ao DDT foi de 79.5% sugerindo resistência. Os demais inseticidas mataram 100% dos flebotomíneos expostos. Ainda no país, o primeiro registro de resistência de flebotomíneos ao organofosforado malation foi registrada para *Ph. papatasi*. No estudo, apenas 58,6% dos flebotomíneos morreram após exposição ao malation 5% (Dhiman & Mittal 2000).

O flebotomíneo *Ph. argentipes* - principal vetora de *Leishmania donovani* no Velho Mundo apresentou taxa de mortalidade de cerca de 50% para DDT 4%, sendo registrado a primeira evidência de resistência a esse produto, em 2003 (Dhiman et al. 2003). No Sudão, Hassan et al. (2012) avaliaram a suscetibilidade de *Ph. papatasi* aos inseticidas DDT 4%, permetrina 0,75%, propoxur 0,1% e malation 5%. Os flebotomíneos se mostraram resistentes a propoxur e malation, que segundo os autores pode ser devido à grande exposição a estes inseticidas em campanhas contra mosquitos anofelinos.

Estudos de avaliação de resistência de flebotomíneos foram realizados em países endêmicos para leishmanioses, como Israel, Irã, Egito, Venezuela, Colômbia, Índia e Bangladesh, porém diferentes espécies de flebotomíneos mostraram-se suscetíveis a diversos grupos de inseticidas (Pener &

Wilamovsky 1987, Rashti et al. 1992, Aboul Ela et al. 1993, Mazzari et al. 1997, Santamaria et al. 2002, Singh et al. 2012, Chowdhury et al. 2018).

No Brasil, cinco ensaios de resistência de flebotomíneos foram realizados (Falcão 1963, Falcão et al. 1988, Alexander et al. 2009, Gonzalez et al. 2019, Rocha et al. 2020), apenas um demonstrou alteração na suscetibilidade desses insetos a dois inseticidas piretróides. Nesse estudo, somente 61,1% e 63,7% dos flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis* morreram após exposição à permetrina e deltametrina, respectivamente (Alexander et al. 2009).

## **1.6 Bioensaios para estudo da resistência em flebotomíneos**

Bioensaios de garrafa (Brogdon & McAllister, 1998) e kits com papéis impregnados (OMS 1981a) são utilizados para caracterizar perfis de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, em condições de laboratório. Em condições de campo utilizam-se os testes de cone fixados em paredes tratadas com inseticidas (OMS 1998). Vale ressaltar que esses métodos são preconizados para avaliação de resistência em mosquitos (Diptera: Culicidae) (Owusu et al. 2015).

Além de diferentes metodologias para avaliação de resistência de flebotomíneos a inseticidas, há registro de diferentes critérios de mortalidade adotados para determinar se um inseto exposto estaria ou não morto. Contudo, a grande maioria dos trabalhos não menciona os critérios de mortalidade dos insetos.

Caso o critério de mortalidade seja a ausência total de movimentos dos flebotomíneos (Marceló et al. 2014, Denlinger et al. 2015) o tempo do experimento tenderá a ser mais longo, em relação ao critério que considera insetos mortos àqueles que apresentam voos descoordenados e incapacidade de permanecer de pé (Alexander et al. 2009, Pessoa et al. 2015). Nesse sentido, a determinação de um critério específico de mortalidade é fundamental para que diferentes trabalhos de suscetibilidade possam ser comparados.

Alexander et al. (2009) observaram a constante perda de pernas de flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis* expostos aos inseticidas permetrina, deltametrina e lambda-cialotrina. Esse efeito sub-letal poderia fazer com que os flebótomos fêmeas não conseguissem se alimentar e conseqüentemente, não pudessem transmitir *Leishmania*. Entretanto, Denlinger et al. (2015) e Santamaria et al. (2016) demonstraram que fêmeas de flebotomíneos expostas a inseticidas piretróides e que perdiam pernas foram capazes de se alimentar em roedores anestesiados. Portanto, novos estudos avaliando este efeito devem ser realizados para definir se insetos moribundos são capazes de alimentar e transmitir patógenos.

Comumente, a acetona é o diluente utilizado nos bioensaios de garrafas do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), porém sabe-se quando expostos durante muito tempo produz efeito anestésico sobre insetos, os quais podem levar a morte. Henriquez et al. (2009) verificaram a repelência de *Pi. evansi* em garrafas impregnadas com lambda-cialotrina e deltametrina diluídos com acetona. Porém, as garrafas impregnadas com os mesmos inseticidas misturados em álcool não interferiram no comportamento dos insetos. Desta forma, a análise do efeito dos diluentes na mortalidade dos flebotomíneos se faz necessária.

Outra grande dificuldade em se desenvolver estudos de resistência e suscetibilidade a inseticidas tem sido determinar uma linhagem suscetível que possa ser utilizada como referência. Como preconizado pela Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) (OPAS 2005) entende-se por Linhagem Referência de Suscetibilidade (LRS) aquela que: i) apresente pelo menos mais de cinco gerações criados sob condições de laboratório, sem contato com inseticidas; ii) não tenha acréscimo de novos insetos na colônia durante as últimas cinco gerações e iii) a população não pode ter tido contato com inseticidas. A partir da LRS, é possível classificar as populações do campo, em suscetível ou resistente, e essa informação é essencial para tomadas de decisão no controle desses vetores.

Pessoa et al. (2015) indicaram a população de *Lu. longipalpis* provenientes da Gruta da Lapinha, Minas Gerais, Brasil como LRS. Essa

população atendeu as recomendações da OPAS e se mostrou suscetível nos bioensaios realizados. Os autores ainda recomendaram testes com flebotômíneos de colônias de Jacobina, na Bahia e de Espírito Santo do Pinhal, em São Paulo para definir uma população de flebotômíneo mais suscetível do que os provenientes da Gruta da Lapinha.

A partir da definição da LRS é possível estimar a Dose Diagnóstica (DD) e o Tempo Diagnóstico (TD), que são a menor dose de um determinado inseticida que mata 100% dos insetos de uma população suscetível em um tempo mínimo (Henriquez et al. 2009). Por meio desses parâmetros é possível caracterizar a resistência de flebotômíneos de campo, caso estes sobrevivam aos testes com a DD no TD.

Ressalta-se que as informações a respeito da ocorrência de resistência em espécies de flebotômíneos são de extrema importância para o delineamento de controle das leishmanioses e que praticamente nada se conhece a respeito da estratégia de inseticidas preconizada pelo MS do Brasil para as espécies de flebotômíneos brasileiros (Pessoa et al. 2015).

## 2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses, antes vistas como doenças rurais, estão ampliando a sua distribuição geográfica em direção aos centros urbanos e periferia de grandes cidades. Estima-se que ocorram 1,8 milhões de casos novos a cada ano, produzindo epidemias e aumento da taxa de incidência e letalidade nestas regiões (OMS 2020). No Brasil, o Ministério da Saúde, por meio do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral e Programa de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, recomendam o diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos, controle dos vetores, realização de inquéritos sorológicos nas populações caninas seguidos da eliminação dos animais soropositivos e educação em saúde (Brasil 2017).

Carvalho et al. (2017) estimaram os custos diretos e indiretos da LV no Brasil no ano de 2014. O valor gasto foi de cerca de 14 milhões de dólares, demonstrando o impacto econômico desta enfermidade, não só devido aos custos diretos com diagnóstico e tratamento, mas também aos indiretos relacionados à perda de produtividade causada pela morbidade e mortalidade prematura.

Devido à falta uma vacina segura e eficiente para combater as leishmanioses, assim como a baixa adesão ao tratamento e diversos efeitos colaterais causados pelos antimoniais pentavalentes, a eliminação do vetor é a melhor forma de interromper a transmissão humana, nas áreas endêmicas. Para reduzir a incidência da doença humana utiliza-se o controle químico, cujas aplicações ocorrem desde a década de 50, contudo, o impacto dessas medidas raramente é avaliado (Gontijo & Melo 2004, Romero & Boelaert 2010, Brasil 2014).

Com o aumento contínuo dos casos de leishmanioses e um histórico de controle químico específico de mais de 60 anos, o monitoramento da suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, principalmente em áreas endêmicas, torna-se fundamental para aprimorar as ações de controle vetorial.

O primeiro registro de resistência de um inseto a um composto químico foi descrito em 1914 (Melander 1914). Desde então, é um importante tema para controle de insetos de importância médica, uma vez que comprometem o sucesso da interrupção das "arthropod borne diseases" (= doenças transmitidas por artrópodes) em países endêmicos. Nas últimas décadas, a resistência dos insetos vetores a inseticidas tem aumentado significativamente e continua a representar uma grande ameaça para o sucesso das intervenções de controle químico como um todo.

A sobreposição de endemias é um fator que pode influenciar no aumento de populações resistentes. A aplicação de inseticida para controle de mosquitos *Aedes aegypti* e *Anopheles* spp., por exemplo, pode atingir, simultaneamente focos pontuais de flebotomíneos em determinadas áreas. Tal situação, pode selecionar organismos resistentes a inseticidas não utilizados especificamente no controle de flebotomíneos.

Geralmente, os bioensaios de garrafas do CDC, kit de papéis impregnados da OMS e teste de cone da OMS são utilizados para avaliação de suscetibilidade de mosquitos. Essas ferramentas devem ser padronizadas para flebotomíneos, porém com a adoção de diferentes critérios de mortalidade e exposição de flebotomíneos levando ou não em consideração a idade, sexo, tipo de diluente e estado nutricional.

Outra grande dificuldade em se desenvolver estudos de resistência e suscetibilidade a inseticidas com flebotomíneos tem sido determinar uma linhagem suscetível que possa ser utilizada como referência. Na qual populações de campo possam ser comparadas a ela e caracterizadas, com maior precisão, em resistentes ou suscetíveis a um determinado inseticida.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- ✓ Revisar o perfil de resistência de Phlebotominae a inseticidas e dos bioensaios de determinação da suscetibilidade do flebotomíneo *Lu. longipalpis* ao inseticida alfacipermetrina.

#### 3.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar e descrever os registros de resistência de diferentes espécies de flebotomíneos aos inseticidas utilizados no seu controle, entre janeiro de 1940 e dezembro de 2019;
- ✓ Analisar a influência dos parâmetros biológicos idade, sexo e estado nutricional de *Lu. longipalpis* expostos ao piretróide alfacipermetrina;
- ✓ Comparar potenciais populações de *Lu. longipalpis* para Linhagem Referência de Suscetibilidade em bioensaios de laboratório;
- ✓ Avaliar o impacto de parâmetros metodológicos na suscetibilidade de flebotomíneos;
- ✓ Verificar se perda de pernas, causadas pela exposição à inseticidas, influencia na alimentação dos flebotomíneos.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Revisão sistemática para o perfil de resistência de flebotomíneos a inseticidas no mundo**

A revisão sistemática seguiu as diretrizes PRISMA (Principais Itens para Relatar Revisões Sistemáticas e Meta-análises). A estratégia de busca e seleção de estudos foram definidos de acordo com quatro itens fundamentais: i) fontes de busca – quatro bases de dados eletrônicas indexadas, Pubmed/Medline, Scopus, BVS e ScienceDirect, e literatura cinzenta; ii) idioma – inglês, espanhol e português; iii) termos MeSH (Medical Subject Headings) - selecionados de acordo com a estratégia PICO, no qual a população, a intervenção utilizada e os desfechos foram adotados; e iv) data de publicação – artigos publicados entre 1940 e dezembro de 2019. A busca na literatura foi realizada no dia 27 de dezembro de 2019 (Figura 8).

Os trabalhos recuperados foram armazenados no software de gerenciamento de referências EndNote X7, em seguida os artigos duplicados foram removidos. Realizou-se então, a seleção dos artigos de acordo com a leitura de títulos e resumo. Os artigos selecionados foram lidos na íntegra, considerando os critérios de inclusão e exclusão pré-definidos, para determinar sua elegibilidade.

Como critérios de inclusão, os seguintes itens foram considerados: i- artigos científicos que abordam ensaios biológicos para avaliação de resistência de flebotomíneos a inseticidas; ii - artigos que utilizaram uma possível linhagem referência de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas; iii - artigos de padronização das técnicas de avaliação de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas; iv - artigos que apontem parâmetros de avaliação do status de suscetibilidade de populações de flebotomíneos; e v – artigos publicados em Inglês, Espanhol e Português.



Pubmed/Medline

```
((("lutzomyia"[All Fields] OR "phlebotomus"[All Fields]) AND  
"insecticide"[All Fields]) AND "insecticide resistance"[All Fields]) OR  
"insecticide susceptibility"[All Fields]
```

Scopus

```
( ALL ( lutzomyia ) OR ALL ( phlebotomus ) AND ALL ( insecticide )  
AND ALL ( "insecticide resistance" ) OR ALL ( "insecticide  
susceptibility" ))
```

BVS

```
tw:((tw:("lutzomyia")) OR (tw:("phlebotomus"))) AND  
(tw:("insecticide")) AND (tw:("insecticide resistance")) OR  
(tw:("insecticide susceptibility"))
```

ScienceDirect

```
lutzomyia OR phlebotomus AND insecticide AND "insecticide  
resistance" OR "insecticide susceptibility"
```

Figura 8. Estratégia de busca dos estudos de resistência de flebotomíneos a inseticidas em quatro bases de dados de referências científicas da área biomédica.

Para exclusão de artigos utilizou-se os seguintes itens: i- artigos com inseticidas não utilizados no controle de vetores de importância médica; ii- artigos de controle de flebotomíneos com inseticidas; iii - artigos de avaliação de residualidade de inseticidas em paredes ou mosquiteiros; iv - artigos com coleiras impregnadas com inseticidas; v - artigos avaliando formas imaturas de flebotomíneos; vi - artigos que trataram da caracterização da suscetibilidade com ensaios bioquímicos e/ou moleculares de flebotomíneos; vii – resumos de congressos, dissertações de mestrado e teses de doutorado.

Todos os artigos incluídos, após aplicação dos critérios, foram categorizados e as informações sobre autores, período e local do estudo, objetivos, espécie alvo, tipo de inseticida, origem da população, sexo, tipo de

metodologia, bem como os critérios de classificação de resistência e conclusões foram extraídos. Na discussão, nenhum artigo foi excluído por causa da qualidade da pesquisa.

#### **4.2. Material biológico**

Colônia de insetos suscetíveis – Foram utilizadas duas populações da espécie *Lu. longipalpis*. A primeira foi oriunda do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e oriundos de Teresina, Piauí (S 5° 9' 0,2"; W 42° 80' 0,38"). Trata-se de uma colônia mantida em insetário desde 2010. A segunda foi procedente de Jacobina (Bahia) e criados no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos (LBFI) do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz) do Rio de Janeiro. Trata-se de uma colônia mantida em insetário desde 1970. Ambas as colônias não possuem aporte de material externo e são mantidas em condições semi-controladas de temperatura e umidade ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $65 \pm 10\%$  UR), com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro e a alimentação dos insetos foi realizada semanalmente em roedores (CEUA-16/2017).

Insetos de campo – Flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis* capturados no município de Montes Claros, Minas Gerais (S 16° 41' 52.9" W 043° 51' 53.0"), área endêmica de leishmaniose visceral e com histórico de controle químico, também foram utilizados no estudo. A captura dos flebotomíneos ocorreu por meio de gaiolas de nylon acopladas às armadilhas luminosas, dos tipos HP (Pugedo et al. 2005) e CDC (Sudia & Chamberlain 1962), instaladas no crepúsculo (18:00 horas) e retiradas no início da manhã (07:00 horas). As gaiolas foram acondicionadas com toalhas úmidas para manter a umidade e transportadas para o laboratório de entomologia do município. No laboratório, os flebotomíneos foram aclimatados por duas horas, com oferta de alimentação açucarada, antes do início dos testes.

Os flebotomíneos capturados em campo, após a realização dos testes, foram armazenados em álcool 70% e transportados ao Laboratório de

Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília para posterior identificação. Machos e fêmeas foram montados e clarificados, segundo Forattini (1973) e identificados utilizando o aplicativo LutzoDex (Rocha et al. 2019).

### **4.3. Inseticidas e diluentes**

Inseticida Grau Técnico - Os inseticidas utilizados nos bioensaios foram o piretróide alfacipermetrina ( $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$ ), da BASF, com grau de pureza de 99% e carbamato bendiocarb ( $C_{11}H_{13}NO_4$ ), da BAYER, com grau de pureza de 98%.

Os inseticidas, grau técnico (em pó), foram diluídos em acetona (PA) para preparação da solução mãe. Nesta parte um total de 0,002 gramas de alfacipermetrina (ingrediente ativo) foi pesado em balança eletrônica de precisão, AG 200 GEHAKA, e misturado a 100 mL de acetona (PA) e álcool etílico (PA). Em seguida, a solução mãe foi fracionada na sub concentração de 3  $\mu\text{g/mL}$ . Para preparo do inseticida bendiocarb foram pesados 0,002 gramas (ingrediente ativo) e combinados com acetona (PA) e álcool etílico (PA). A partir da solução mãe foi preparado a sub dose de 3  $\mu\text{g/mL}$ .

Diluentes - Acetona ( $CH_3$ ) $_2$ CO para análise (PA) e álcool etílico  $C_2H_6O$  (PA) foram usados para análise do melhor diluente para testes com garrafas do CDC.

### **4.4 Metodologias de avaliação de suscetibilidade**

Nesse estudo foram utilizadas duas metodologias de bioensaios de avaliação de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas: bioensaio de garrafa do CDC (Figura 9), descrita por Brogdon & McAllister (1998) e bioensaios de cone modificado (Pessoa et al. 2015) (Figura 10).

O bioensaio preconizado pelo CDC constou da utilização de garrafas do tipo Wheaton com volume de 250 mL, as quais foram impregnadas internamente com diluente (controle) e alfacipermetrina a 3  $\mu\text{g/mL}$  e/ou

bendiocarb a 3 µg/mL. Todos os frascos foram impregnados uniformemente nas partes laterais, superior e inferior por meio de rotação do recipiente e observação criteriosa da impregnação. Após a isto, as garrafas foram abertas, para evitar condensação, e ficaram armazenadas em locais protegidos da luz durante 24 horas.

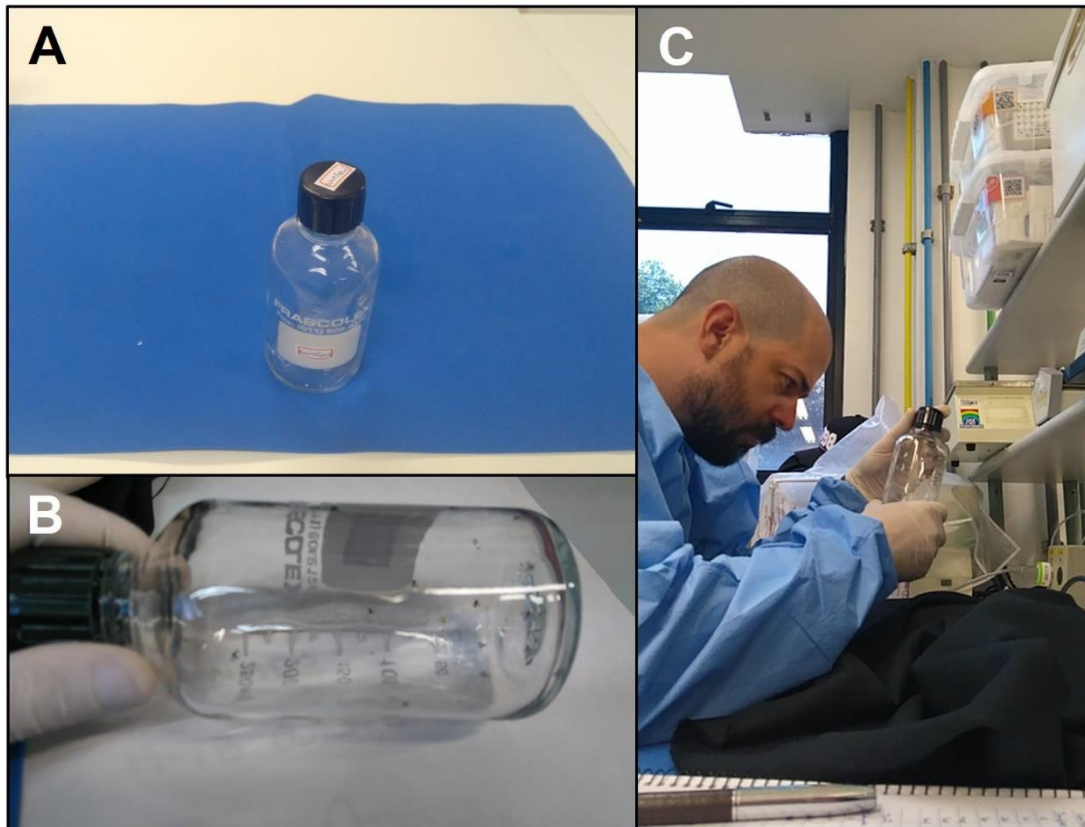


Figura 9. Bioensaio de garrafa do CDC para avaliação da suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas. A: Garrafa Wheaton para avaliação do bioensaio; B: Flebotomíneos na garrafa durante a avaliação de suscetibilidade; C: Avaliação de mortalidade dos flebotomíneos no bioensaio de garrafa.

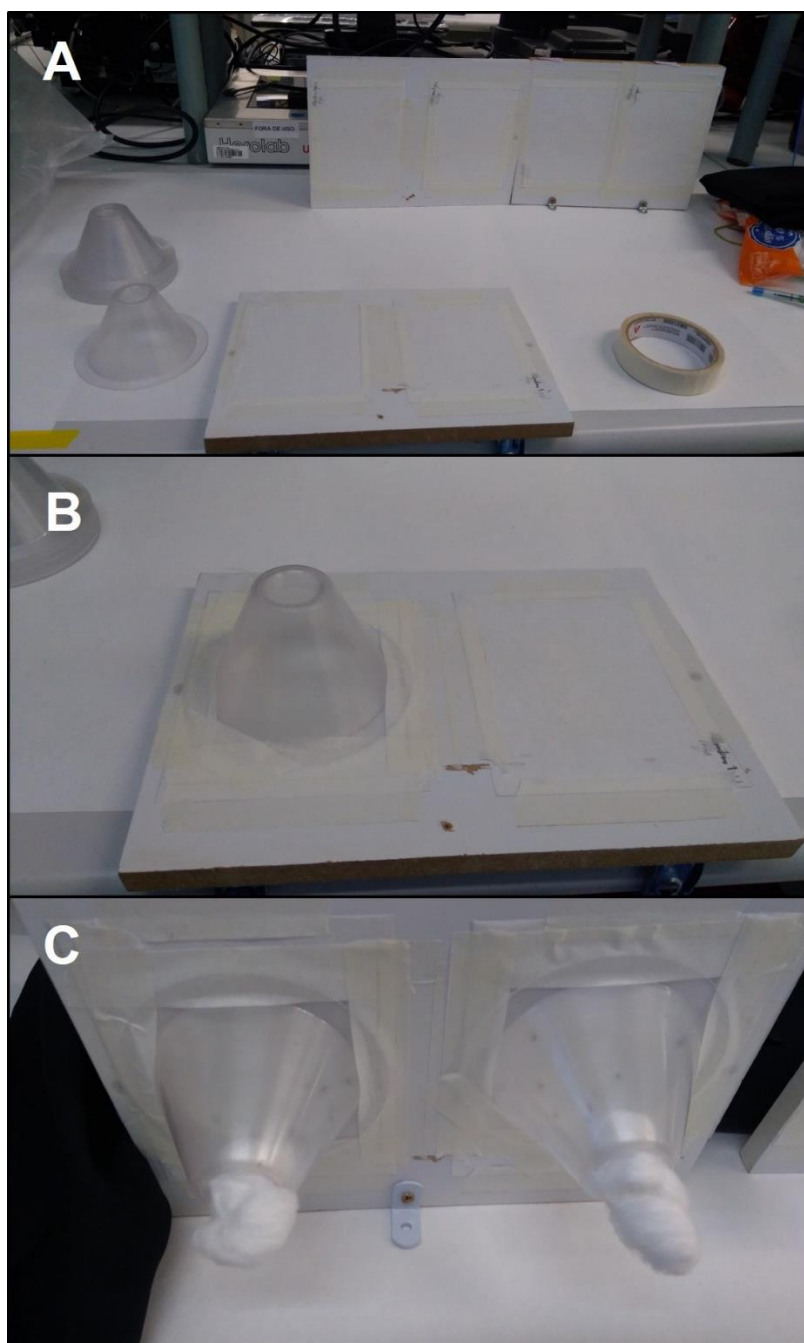


Figura 10. Bioensaio de cones para avaliação da suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas. A: Fixação dos papéis impregnados; B: Fixação dos cones; C: Flebotomíneos no bioensaio de cones durante a avaliação de suscetibilidade.

Normalmente, a prova de cone da OMS (OMS, 1998) é realizada em paredes tratadas com inseticidas, onde os insetos ficam presos no interior dos cones e pousam nas paredes, entrando em contato com produto. Nessas provas objetiva-se avaliar principalmente a efetividade e residualidade dos inseticidas nas paredes. Contudo, nesse trabalho, foi utilizada a metodologia recomendada por (Pessoa et al. 2015) e a exposição ocorreu por meio de papéis impregnados com alfacipermetrina a 3 µg/mL e/ou bendiocarb a 3 µg/mL. Para a impregnação dos papéis foram utilizados papéis-filtro do tipo Whatman (nº 1) cortados em pedaços de 11,5 cm por 14 cm. Cada pedaço foi apoiado sobre um aparato de impregnação, que consiste em um suporte de madeira (40 cm x 40 cm) coberto por pequenos pregos de metal distribuídos uniformemente em todo o suporte. O papel foi colocado sobre esse suporte e com o auxílio de pipeta multicanal (Eppendorf Research Plus) ocorreu a impregnação dos papéis. Após a impregnação, os papéis foram colocados para secar durante 48 horas, ao abrigo da luz. Quando secos, os papéis foram presos a uma placa de petri com auxílio de fitas adesivas. Depois disso, a placa foi presa ao cone, de modo que os insetos ficassem expostos ao papel impregnado.

#### **4.5 Análise dos parâmetros biológicos, idade, sexo e estado nutricional**

Os bioensaios foram separados de acordo com a metodologia de avaliação, idade, sexo e estado nutricional dos insetos (Figura 11). Para cada grupo (machos alimentados com açúcar OU fêmeas alimentadas com açúcar OU fêmeas alimentadas com sangue) foram expostos 10 exemplares por réplica. Cada ensaio foi repetido três vezes em dias diferentes, totalizando 30 insetos. A mortalidade dos insetos foi registrada a cada 10 minutos e o fim da avaliação de suscetibilidade ocorreu após a verificação da morte de todos os flebotomíneos expostos.

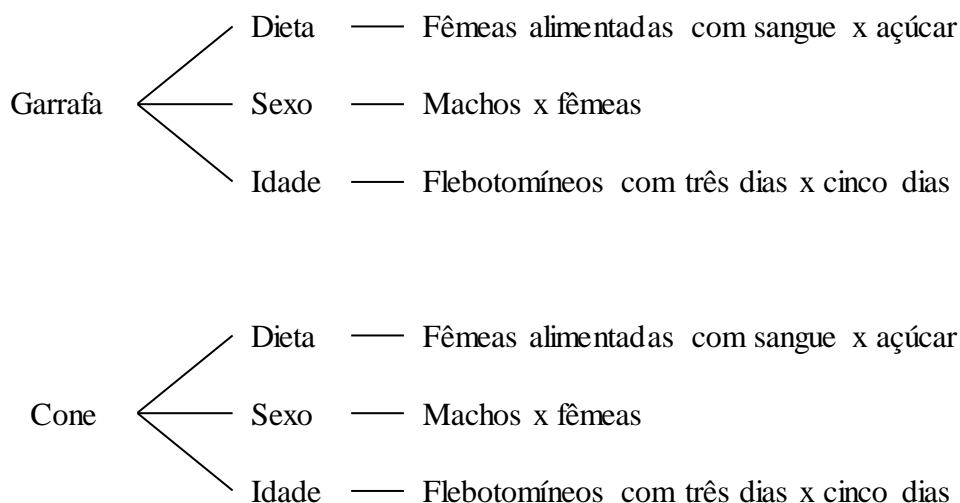


Figura 11. Esquema organizacional dos bioensaios de garrafa e cone com a espécie *Lu. longipalpis* expostas a 3 µg/mL de alfacipermetrina.

#### 4.6 Comparação de populações para indicação de Linhagem Referência de Suscetibilidade

As populações de *Lu. longipalpis* de Jacobina-BA e Teresina-PI, potenciais LRS, e a população de *Lu. longipalpis* de Montes Claros (utilizada aqui como população controle), foram avaliadas por meio de ensaios biológicos com a metodologia de garrafas de Brogdon & McAllister (1998) e uma metodologia adaptada de cones (Pessoa et al. 2015). Em ambas metodologias, os flebotomíneos foram expostos ao piretróide alfacipermetrina na concentração de 3 µg/mL.

Vale ressaltar que *Lu. longipalpis* de Montes Claros foi caracterizada por Alexander et al. (2009) como tolerante aos piretróides deltametrina e permetrina. Dessa forma, essa população foi utilizada como controle positivo nos experimentos para caracterização de uma população suscetível de flebotomíneos.

Para as três populações, os insetos foram separados em machos e fêmeas, em proporções iguais e introduzidos nas garrafas e cones com auxílio de um capturador de castro. Um total de 120 flebotomíneos foram testados por metodologia para avaliação da mortalidade. A cada 10 minutos, as

garrafas e os cones eram avaliados para contagem do número de flebotomíneos que permaneciam vivos. Os bioensaios foram repetidos cinco vezes e a leitura de mortalidade foi realizada por um único pesquisador. Os flebotomíneos foram considerados mortos quando não conseguiam se manter de pé e/ou apresentavam voos descoordenados.

#### **4.7 Análise dos parâmetros metodológicos, diluentes e critério de mortalidade**

Álcool etílico (PA) e acetona (PA) foram comparados para avaliação do melhor diluente para ensaios biológicos de suscetibilidade com a metodologia de garrafa e de cones. Para isto, flebotomíneos fêmeas com cinco dias de idade foram avaliados durante três e 24 horas de exposição. Dez insetos foram analisados por réplica e repetidos três vezes.

Para avaliação da mortalidade dos flebotomíneos, dois critérios foram avaliados: critério A – os insetos que apresentaram incapacidade de voar ou ficar de pé foram considerados mortos (OMS 1998, Brogdon & Chan 2010); critério B – os insetos foram considerados mortos quando tinham ausência total de movimentos (Marceló et al. 2014, Denlinger et al. 2015).

Para essa avaliação, 60 insetos (30 machos e 30 fêmeas) com três dias de idade e alimentados apenas com solução açucarada, foram expostos à metodologia de garrafas do CDC.

#### **4.8 Análise da perda de pernas dos flebotomíneos à exposição de inseticidas**

Na análise da perda de pernas da espécie *Lu. longipalpis* foram utilizados dois métodos de avaliação (garrafas do CDC e cones da OMS adaptados), assim como dois inseticidas com diferentes modos de ação (alfacipermetrina e bendiocarb). Um total de 30 flebotomíneos foram expostos aos dois inseticidas utilizando-se duas diferentes metodologias e avaliadas durante uma hora. Ao final do experimento foi registrada a perda de pernas



de cada inseto e estes classificados em: i) sem perda – quando apresenta todas as pernas ao final do experimento e ii) com perda – quando perdia uma ou mais pernas ao final do experimento.

Um segundo teste foi realizado para avaliar se flebotomíneos que perdiam pernas conseguiriam se alimentar. Neste ensaio, quatro grupos foram testados: G1 – flebotomíneos expostos a alfacipermetrina impregnada em garrafas do CDC; G2 - flebotomíneos submetidos somente a acetona na metodologia de garrafa; G3 - flebotomíneos apenas acondicionados na garrafa sem impregnação com nenhum produto; G4 - flebotomíneos não submetidos à técnica da garrafa e nem expostos a nenhum produto. Um total de 30 flebotomíneos, 15 machos e 15 fêmeas, com idade entre três e cinco dias foram utilizados em cada grupo e o tempo de exposição foi de 60 minutos.

Todos os grupos foram introduzidos em uma gaiola de acrílico transparente, com 32 cm de altura, 32 cm de largura e 32 cm de comprimento, com a presença de um hamster (*Mesocricetus auratus*) anestesiado e de um pedaço de algodão embebido em solução açucarada a 30% (Figura 12).

Os flebotomíneos foram colocados em uma extremidade da gaiola por meio de um capturador de Castro. Na outra extremidade foi disponibilizado a fonte alimentar e a solução açucarada, na qual a distância foi de 30 cm. Abaixo da gaiola foi colocada uma régua para mensurar o deslocamento dos insetos. A avaliação foi finalizada após 60 minutos, sendo registrada a capacidade de alimentação e deslocamento dos flebotomíneos.

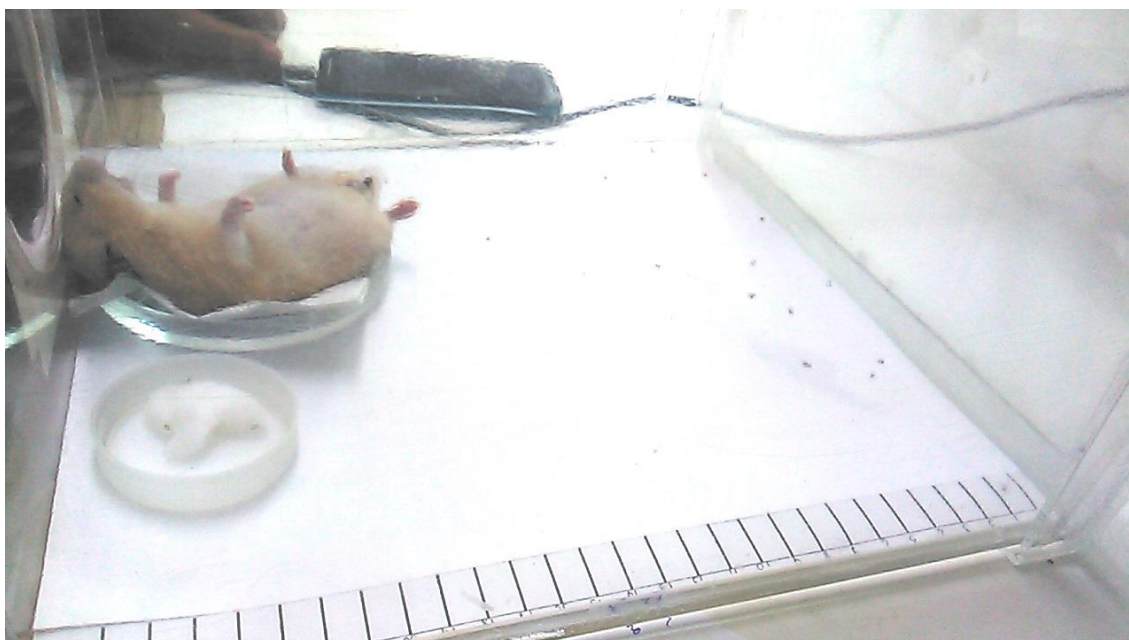


Figura 12. Avaliação da alimentação dos flebotomíneos em fontes sanguíneas e açucaradas após exposição à alfacipermetrina a 3 µg/mL e acetona com a metodologia de garrafa do CDC.

#### 4.9 Análise estatística

Os dados de mortalidade dos flebotomíneos, obtidos nos bioensaios, foram utilizados para estimar o Tempo Letal (TL), ou seja, o intervalo de tempo que leva para matar um determinado número de insetos. Neste trabalho foi estimado o TL<sub>50</sub>, TL<sub>90</sub> e TL<sub>95</sub> (mortalidade de 50%, 90% e 95%, respectivamente) das amostras estudadas.

As curvas de sobrevivência das populações de flebotomíneos foram inferidas pelo método de Kaplan-Meier (KM), que consiste em análise de sobrevivência em que os intervalos de tempo não são fixos, mas determinados pela morte dos flebotomíneos (Bustamante-Teixeira et al. 2002).

A comparação da mortalidade dos flebotomíneos expostos a diferentes variáveis (diluente, alimentação dos flebotomíneos, metodologia) foi avaliada pela análise Qui-quadrado ( $X^2$ )

As estimativas de TL, as curvas de sobrevivência e os testes de  $X^2$  foram calculadas utilizando o programa estatístico JMP 10 (SAS 2018).

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Revisão sistemática de bioensaios para detecção de resistência de flebotomíneos a inseticidas**

Foram encontrados 3481 artigos científicos nas quatro bases de dados. Após a exclusão de artigos duplicados e de análise do título e resumo dos artigos restantes, foram excluídos 3406 artigos. Restavam 75 artigos para serem lidos na íntegra, abordando o tema de interesse nesta revisão. No entanto, 13 desses artigos não atenderam aos critérios de inclusão e foram excluídos, dez por avaliar o controle de flebotomíneos, dois pelo idioma e um por lidar com análises bioquímicas e / ou moleculares. Além disso, três estudos não estavam disponíveis na literatura e não obtivemos resposta do autor após a solicitação do manuscrito. Dois artigos, não detectados na busca pelas bases de dados, foram adicionados. Ao final da pesquisa, foram selecionados 61 artigos para o estudo (Figura 13).

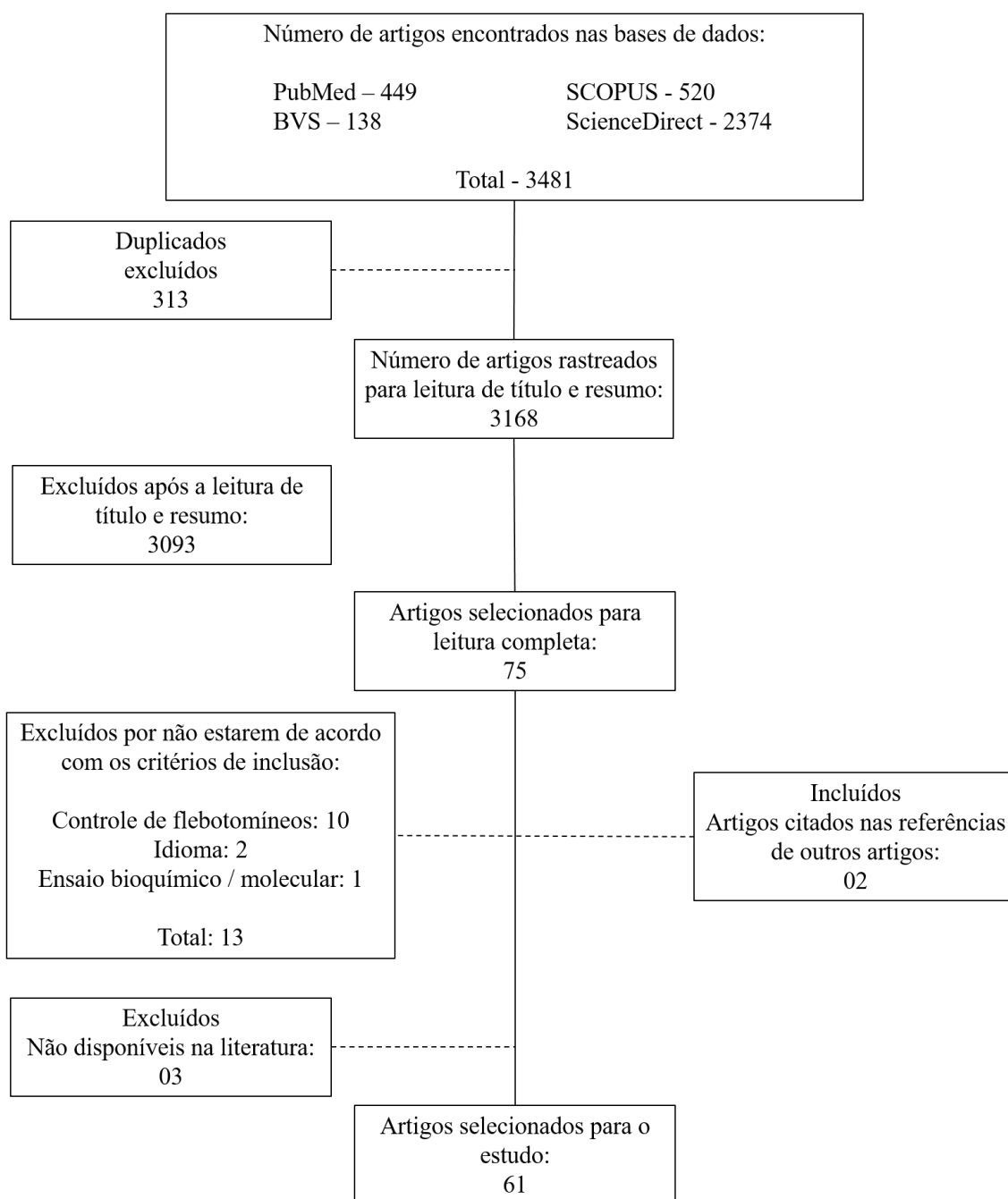


Figura 13. Fluxograma de inclusão e exclusão de estudos a respeito dos bioensaios de laboratório de suscetibilidade/resistência de flebotomíneos.

***Panorama de Resistência de Phlebotominae*** - A Tabela 1 mostra os resultados de suscetibilidade/resistência de flebotomíneos. Atualmente, há 47 populações de Phlebotominae com resistência confirmada (Figura 14) para um ou mais inseticidas e outras 28 populações consideradas tolerantes (Figura 15). A Índia é o país com o maior número de populações com alterações de suscetibilidade. Com exceção de uma população de flebotomíneos da Turquia e outra do Egito, todas as outras 45 são oriundas da Índia.

Tabela 1. Principais características dos estudos de suscetibilidade e resistência de flebotomíneos a inseticidas.

Referência	País	Espécie	Inseticida	Origem	Sexo	Método	Status
Kirk et al. 1949	Sudão	<i>Ph. clydei</i>	DDT	Campo	♂♀	Tubo	S
		<i>Ph. papatasi</i>					S
Hadjinicolaou et al. 1958	Grécia	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Campo	♂♀	Tubo	S
			Dieldrin				S
Falcão 1963	Brasil	<i>Lu. longipalpis</i>	DDT	Campo	♀	OMS	S
			Dieldrin				S
Schmidt & Schmidt 1969	Egito e Sudão	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Campo e Colônia (F1)	♀	OMS	S, T
			Dieldrin				S, T
Kaul et al. 1978	Índia	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Campo	♀	OMS	S
			Dieldrin				S

Cont. da tabela 1. Principais características dos estudos de suscetibilidade e resistência de flebotomíneos a inseticidas.

Referência	País	Espécie	Inseticida	Origem	Sexo	Método	Status
Kaul et al. 1978	Índia	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Campo	♀	OMS	R
			Dieldrin				S
Joshi et al. 1979	Índia	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Campo	♀	OMS	S
			Dieldrin				S
		<i>Ph. papatasi</i>	DDT				R
			Dieldrin				S
Rahman et al. 1982	Índia	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Campo	♀	OMS	R
Dhanda et al. 1983	Índia	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Campo	♀	OMS	R <sup>1</sup>
			Malation				S
Artemiev et al. 1984	Azerbaijão	<i>Ph. brevis</i>	DDT	Campo	♀	OMS	S
		<i>Ph. transcaucasicus</i>					S
Pener et al. 1987	Israel	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Colônia	♀	OMS	S

Cont. da tabela 1. Principais características dos estudos de suscetibilidade e resistência de flebotomíneos a inseticidas.

Referência	País	Espécie	Inseticida	Origem	Sexo	Método	Status
Pener et al. 1987	Israel	<i>Ph. papatasi</i>	Metoxicloro	Colônia	♀	OMS	T
			Permetrina				S
Falcão et al. 1988	Brasil	<i>Lu. longipalpis</i>	Deltametrina	Campo	♀	OMS	S
Mukhopadhyay et al. 1990	Índia	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Campo	♀	OMS	T
			DDT				S
Lavagino & Ansaldi 1991	Itália	<i>Ph. perniciosus</i>	Malation	Campo	♀	OMS	S
			Permetrina				S
		<i>Ph. perfiliewi</i>	DDT	Campo	♀	OMS	S
			Permetrina				S
Mukhopadhyay et al. 1992	Índia	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Campo e Colônia (F1)	♀	OMS	R
Rashti et al. 1992	Irã	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Campo	♀	OMS	S



Cont. da tabela 1. Principais características dos estudos de suscetibilidade e resistência de flebotomíneos a inseticidas.

Referência	País	Espécie	Inseticida	Origem	Sexo	Método	Status
Aboul Ela et al. 1993	Egito	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Campo	♀	OMS	S
			BHC				S
			Permetrina				S
			Malation				S
			Propoxur				S
Kaul et al. 1993	Índia	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Campo	♀	OMS	R
		<i>Ph. papatasi</i>					R
Kaul et al. 1994	Índia	<i>Se. shorttii</i>	DDT	Campo	♀	OMS	R
			Malation				S
			Fenitrotiona				S
Basak & Tandon 1995	Índia	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Campo	♀	OMS	R
Chandra et al. 1995	Índia	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Campo	♀	OMS	S

Cont. da tabela 1. Principais características dos estudos de suscetibilidade e resistência de flebotomíneos a inseticidas.

Referência	País	Espécie	Inseticida	Origem	Sexo	Método	Status
Chandra et al. 1995	Índia	<i>Ph. argentipes</i>	Dieldrin	Campo	♀	OMS	S
			Malation				S
Das Grupta et al. 1995	Índia	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Campo	♀	OMS	R <sup>2</sup>
Bansal & Singh 1996	Índia	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Campo	♀	OMS	R
			Dieldrin				R
			Malation				S
			Fenitrotiona				S
			Propoxur				R
			Permetrina				S
Bansal & Singh 1996b	Índia	<i>Se. punjabaensis</i>	DDT	Campo	♀	OMS	S
			Dieldrin				S
			Malation				S

Cont. da tabela 1. Principais características dos estudos de suscetibilidade e resistência de flebotomíneos a inseticidas.

Referência	País	Espécie	Inseticida	Origem	Sexo	Método	Status
Bansal & Singh 1996b	Índia	<i>Se. punjabaensis</i>	Fenitrotiona	Campo	♀	OMS	S
			Propoxur				S
			Permetrina				S
Fahmy et al. 1996	Egito	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Campo	♂♀	OMS	S
			Dieldrin				S
			Malation				S
			Propoxur				S
			Deltametrina				S
			Permetrina				S
Singh & Bansal 1996	Índia	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Campo	♀	OMS	R <sup>3</sup>
			Dieldrin				S
			Malation				S

Cont. da tabela 1. Principais características dos estudos de suscetibilidade e resistência de flebotomíneos a inseticidas.

Referência	País	Espécie	Inseticida	Origem	Sexo	Método	Status
Singh & Bansal 1996	Índia	<i>Ph. papatasi</i>	Fenitrotiona	Campo	♀	OMS	S
			Propoxur				S
			DDT				S
			Propoxur				S
			Malation				S
Mazzarri et al. 1997	Venezuela	<i>Lu. longipalpis</i>	Fenitrotiona	Campo x Colônia	♀	OMS	T
			Pirimifós				T
			Deltametrina				S
			Lambda-cialotrina				S
			Permetrina				S
Amalraj et al. 1999	Índia	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Campo	♂♀	OMS	T
			BHC				T

Cont. da tabela 1. Principais características dos estudos de suscetibilidade e resistência de flebotomíneos a inseticidas.

Referência	País	Espécie	Inseticida	Origem	Sexo	Método	Status
Amalraj et al. 1999	Índia	<i>Ph. argentipes</i>	Malation				T
			Deltametrina				R
			Permetrina	Campo	♂♀	OMS	R
			Lambda-cialotrina				T
			Bendiocarb				S
			DDT				T
			BHC				S
		<i>Ph. papatasi</i>	Malation				T
			Deltametrina				T
			Permetrina				R
			Lambda-cialotrina				R
			Bendiocarb				S

Cont. da tabela 1. Principais características dos estudos de suscetibilidade e resistência de flebotomíneos a inseticidas.

Referência	País	Espécie	Inseticida	Origem	Sexo	Método	Status
Dhiman & Mittal 2000	Índia	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Campo	♀	OMS	R <sup>4</sup>
			Dieldrin				R
			Malation				R
			Deltametrina				S
Singh et al. 2001	Índia	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Campo	♀	OMS	R <sup>5</sup>
Tetrealt et al. 2001	Djibouti e Egito	<i>Ph. bergeroti</i> <i>Ph. langeroni</i> <i>Ph. sergenti</i> <i>Ph. papatasi</i>	Ciflutrina	Colônia	♀	OMS	S
			DDT				S
			Malation				S
			Permetrina				S
			Resmetrina				S
Maroli et al. 2002	Itália	<i>Ph. papatasi</i> <i>Ph. perniciosus</i>	DDT	Campo x Colônia	♀	OMS	S
			Lambda-cialotrina				S

Cont. da tabela 1. Principais características dos estudos de suscetibilidade e resistência de flebotomíneos a inseticidas.

Referência	País	Espécie	Inseticida	Origem	Sexo	Método	Status
Maroli et al. 2002	Itália	<i>Ph. papatasi</i>	Permetrina	Campo x Colônia	♀	OMS	S
Santamaria et al. 2002	Colômbia	<i>Lu. longipalpis</i>	Solventes (óleo de oliva e óleo de silicone)	Colônia	♀	OMS	S
		<i>Lu. serrana</i>		Colônia			S
		<i>Lu. quasitownsendi</i>		Campo			S
Santamaria et al. 2003	Colômbia	<i>Lu. longipalpis</i>	Lambda-cialotrina	Colônia	♀	CDC	S
Dhiman et al. 2003	Índia	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Campo	♂♀	OMS	R
			Deltametrina				S
			Malation				S
Alvarez et al. 2006	Venezuela	<i>Lu. evansi</i>	Lambda-cialotrina	Campo	♀	OMS	S
			Fenitrotiona				S
Alexander et al. 2009	Brasil	<i>Lu. longipalpis</i>	Fenitrotiona	Campo	♂♀	OMS e CDC	S
			Malation				S

Cont. da tabela 1. Principais características dos estudos de suscetibilidade e resistência de flebotomíneos a inseticidas.

Referência	País	Espécie	Inseticida	Origem	Sexo	Método	Status
Alexander et al. 2009	Brasil	<i>Lu. longipalpis</i>	Permetrina	Campo	♂♀	OMS e CDC	T
			Deltametrina				T
			Lambda-cialotrina				S
Henriquez et al. 2009	Colômbia	<i>Lu. evansi</i>	Deltametrina	Campo	♀	CDC	S
			Lambda-cialotrina				S
Dinesh et al. 2010	Índia e Nepal	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Colônia e Campo	♀	OMS	R
			Deltametrina				S
Afshar et al. 2011	Irã	<i>Ph. papatasi</i> <i>Ph. sergenti</i>	DDT	Campo	♂♀	OMS	S
			Deltametrina				S
Faraj et al. 2012	Marrocos	<i>Ph. sergenti</i>	Lambda-cialotrina	Campo	♂♀	OMS	S
			DDT				S
			Malation				S



Cont. da tabela 1. Principais características dos estudos de suscetibilidade e resistência de flebotomíneos a inseticidas.

Referência	País	Espécie	Inseticida	Origem	Sexo	Método	Status
Hassan et al. 2012	Sudão	<i>Ph. papatasi</i>	Permetrina	Campo e Colônia (F1)	♀	OMS	S
			DDT				S
			Malation				S
			Propoxur				S
Saeidi et al. 2012	Irã	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Campo	♂♀	OMS	T
			Permetrina				S
			Deltametrina				S
			Ciflutrina				S
			Lambda-cialotrina				S
Singh et al. 2012	Índia	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Campo	♀	OMS	R
			Malation				S
			Deltametrina				S

Cont. da tabela 1. Principais características dos estudos de suscetibilidade e resistência de flebotomíneos a inseticidas.

Referência	País	Espécie	Inseticida	Origem	Sexo	Método	Status
Saeidi et al. 2013	Irã	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Campo e Colônia (F1)	♂♀	OMS	S
			Permetrina				S
			Deltametrina				S
			Ciflutrina				S
			Lambda-cialotrina				S
Marceló et al. 2014	Colômbia	<i>Lu. longipalpis</i>	Malation	Colônia	♀	CDC	S
			Deltametrina				S
			Lambda-cialotrina				S
Denlinger et al. 2015	Estados Unidos	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Ph. papatasi</i>	Cipermetrina	Colônia	♂♀	OMS	S
			Deltametrina				S
			Lambda-cialotrina				S
			Permetrina				S

Cont. da tabela 1. Principais características dos estudos de suscetibilidade e resistência de flebotomíneos a inseticidas.

Referência	País	Espécie	Inseticida	Origem	Sexo	Método	Status
Denlinger et al. 2015	Estados Unidos	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Ph. papatasi</i>	Clorpirifós	Colônia	♂♀	OMS	S
			Fenitroiona				S
			Malation				S
			Bendiocarb				S
			Propoxur				S
			DDT				S
Kumar et al. 2015	Índia	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Campo	♀	OMS	R
Li et al. 2015	Estados Unidos	<i>Ph. papatasi</i> <i>Ph. duboscqi</i>	Cipermetrina	Colônia	♂	Tubo	S
			Deltametrina				S
			Ciflutrina				S
			Lambda-cialotrina				S
			Permetrina				S

Cont. da tabela 1. Principais características dos estudos de suscetibilidade e resistência de flebotomíneos a inseticidas.

Referência	País	Espécie	Inseticida	Origem	Sexo	Método	Status
Li et al. 2015	Estados Unidos	<i>Ph. papatasi</i> <i>Ph. duboscqi</i>	Praetrina	Colônia	♂	Tubo	S
			Clorpirifós				S
			Coumafós				S
			Diazinon				S
			Diclorvós				S
			Etofenprox				S
			Carbaryl				S
			Malation				S
Pessoa et al. 2015	Brasil	<i>Lu. longipalpis</i>	Alfa-cipermetrina	Campo	♀	Cone	S
Singh et al. 2015	Índia	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Campo	♀	OMS	R, T <sup>6</sup>
			Malation				R, T <sup>7</sup>
			Deltametrina				S

Cont. da tabela 1. Principais características dos estudos de suscetibilidade e resistência de flebotomíneos a inseticidas.

Referência	País	Espécie	Inseticida	Origem	Sexo	Método	Status
Denlinger et al. 2016	Estados Unidos	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Ph. papatasi</i>	Clorpirifós	Colônia	♂♀	CDC	S
			Fenitrothion				S
			Malation				S
			Bendiocarb				S
			Propoxur				S
			Cipermetrina				S
			Deltametrina				S
			Lambda-cialotrina				S
			Permetrina				S
DDT	S						
Fawaz et al. 2016	Egito	<i>Ph. papatasi</i>	Permetrina	Colônia	♀	CDC	S
				Campo			R

Cont. da tabela 1. Principais características dos estudos de suscetibilidade e resistência de flebotomíneos a inseticidas.

Referência	País	Espécie	Inseticida	Origem	Sexo	Método	Status
Nandi et al. 2016	Índia	<i>Ph. argentipes</i>	Deltametrina	Campo	♀	OMS	S
			Lambda-cialotrina				S
			Alfa-cipermetrina				S
Karakus et al. 2016	Turquia	Phlebotominae	Deltametrina	Campo	♀	OMS	S
			Permetrina				S
Azamani et al. 2017	Irã	<i>Ph. sergenti</i>	DDT	Campo	♀	OMS	T
			Bendiocarb				T
			Permetrina				T
Karaku et al. 2017	Turquia	Phlebotominae	Deltametrina	Campo	♀	OMS	R
			Permetrina				T
Rama et al. 2017	Índia	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Colônia	♂♀	OMS	S
Bidabadi et al. 2017	Irã	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Campo	♂♀	OMS	T

Cont. da tabela 1. Principais características dos estudos de suscetibilidade e resistência de flebotomíneos a inseticidas.

Referência	País	Espécie	Inseticida	Origem	Sexo	Método	Status
Bidabadi et al. 2017	Irã	<i>Ph. papatasi</i>	Permetrina	Campo	♂♀	OMS	S
			Deltametrina				S
			Ciflutrina				S
			Lambda-cialotrina				S
Chowdhury et al. 2018	Bangladesh e Nepal	<i>Ph. argentipes</i>	Alfa-cipermetrina	Campo	♀	OMS	S
			Deltametrina				S
			Lambda-cialotrina				S
			Permetrina				S
			Malation				S
			Bendiocarb				S
Sardar et al. 2018	Índia	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Campo	♂♀	OMS	R <sup>8</sup>
			Deltametrina				S
			Malation				S

Cont. da tabela 1. Principais características dos estudos de suscetibilidade e resistência de flebotomíneos a inseticidas.

Referência	País	Espécie	Inseticida	Origem	Sexo	Método	Status
Gonzalez et al. 2019	Brasil	<i>Lu. longipalpis</i>	Deltametrina	Campo	♂♀	OMS	S
			Lambda-cialotrina				S

Ph. - *Phlebotomus*; Lu. - *Lutzomyia*; Se. - *Sergentomyia*; OMS - Organização Mundial da Saúde; CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças; S - Suscetível; T - Tolerante; R - Resistente.

1- Duas populações resistentes; 2- Duas populações resistentes; 3- Duas populações resistentes; 4- Duas populações resistentes; 5- Uma população resistente e uma tolerante; 6- Dezesesseis populações resistentes e 15 tolerantes; 7- Uma população resistente e seis tolerantes; 8- Cinco populações resistentes.

\* - Os flebotomíneos foram identificados após os testes.



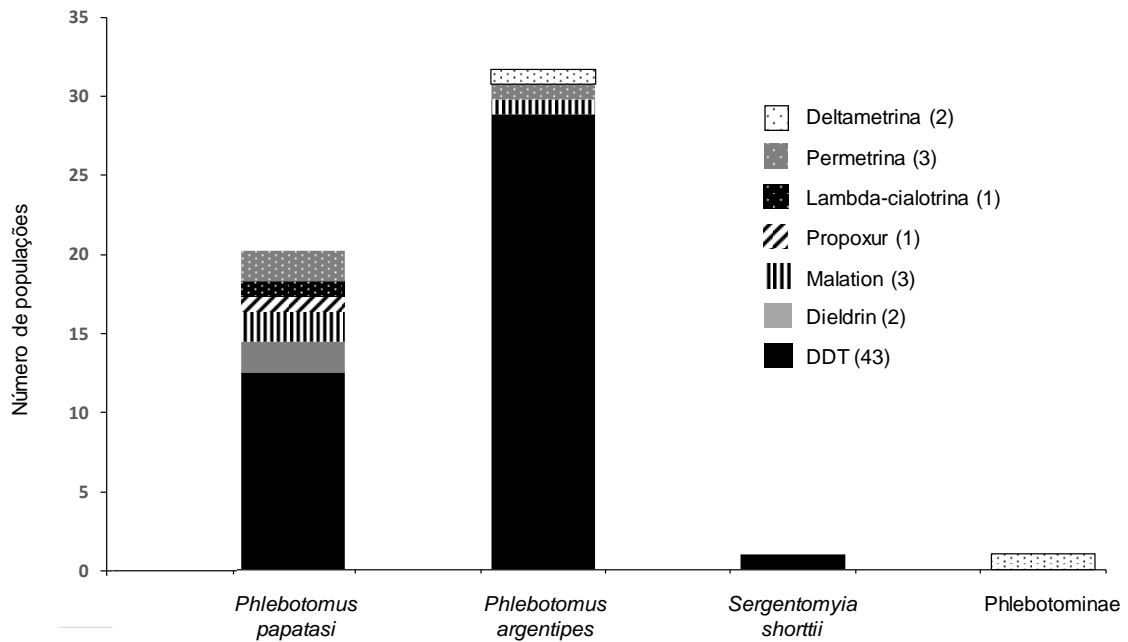


Figura 14. Populações de flebotomíneos resistentes para diferentes classes de inseticidas.

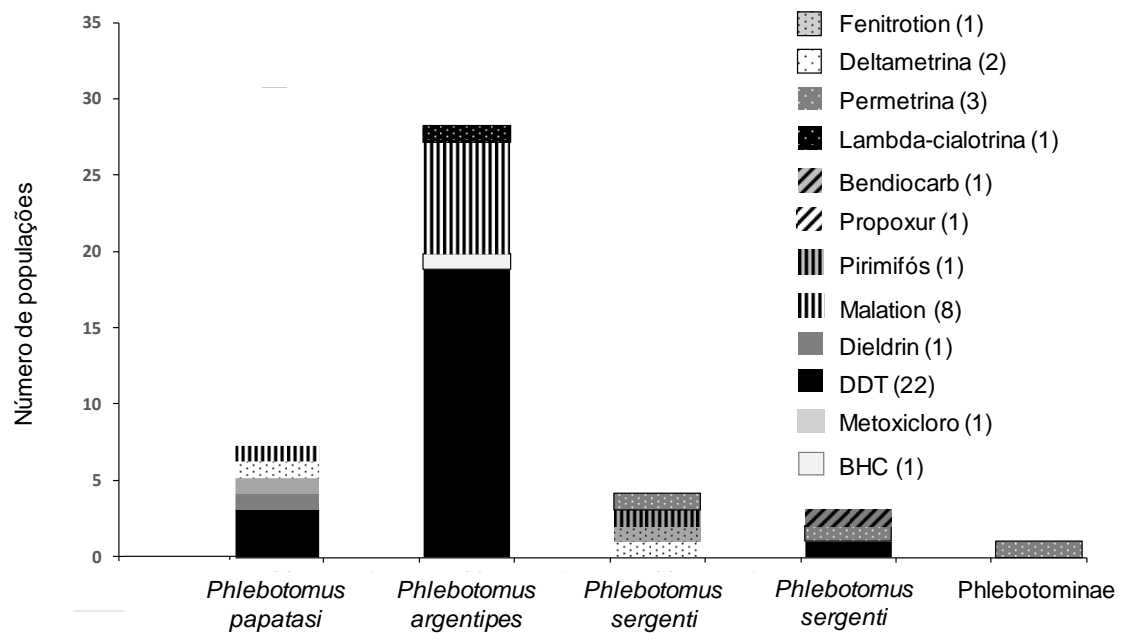


Figura 15. Populações de flebotomíneos tolerantes para diferentes classes de inseticidas.

***Linhagem Referência de Suscetibilidade (LRS)*** – Dos 61 estudos selecionados, apenas três trabalhos realizaram comparações entre os flebotomíneos de campo e LRS (Mazzari et al. 1997, Maroli et al. 2002, Gonzalez et al. 2019). Já dois artigos relatam a utilização de flebotomíneos de campo como população de referência. Essa adoção ocorreu porque estes insetos são provenientes de uma área preservada e sem contato com inseticidas (Alexander et al. 2009, Pessoa et al. 2015) (Tabela 2). Quarenta e cinco trabalhos realizaram os testes com populações coletadas diretamente de campo ou com a geração F1. Outras oito pesquisas determinaram doses e tempos letais ou diagnósticos e/ou simplesmente verificaram suscetibilidade de flebotomíneos de colônia a inseticidas (Pener et al. 1987, Tetreault et al. 2001, Marceló et al. 2014, Denlinger et al. 2015, Li et al. 2015, Denlinger et al. 2016, Fawaz et al. 2016, Rama et al. 2017). E outros três estudos utilizaram populações de colônia para avaliar as metodologias de tubos da OMS (Santamaria et al. 2002) e a de garrafas do CDC (Santamaria et al. (2003), enquanto que Dinesh et al. (2010) avaliaram o impacto da alimentação de flebotomíneos de colônia na suscetibilidade dos mesmos.

Tabela 2. Colônias de flebotomíneos com potencial para Linhagem Referência de Suscetibilidade.

Referência	Espécie	Ano	Origem	Local de criação
Pener et al. 1987	<i>Ph. papatasi</i>	1983	Israel	Laboratório de entomologia, Ministério da Saúde, Jerusalém
Mazzari et al. 1997	<i>Lu. longipalpis</i>	1994	Venezuela	Universidade de Carabobo
Tetreault et al. 2001	<i>Ph. papatasi</i>	1989	Egito	Terceira Unidade Naval de Pesquisa Médica dos EUA, Cairo, Egito
	<i>Ph. sergenti</i>	1996		
Maroli et al. 2002	<i>Ph. papatasi</i>	1990	Itália	NI
Santamaria et al. 2002	<i>Lu. longipalpis</i>	NI	Colômbia	NI
	<i>Lu. serrana</i>	NI		NI
Santamria et al. 2003	<i>Lu. longipalpis</i>	1994	Colômbia	NI
Alexander et al. 2009	<i>Lu. longipalpis</i>	NI	Brasil	Gruta da Lapinha, Minas Gerais. Flebotomíneos de campo
Dinesh et al. 2010*	<i>Ph. argentipes</i>	NI	Índia	Rajendra Memorial Research Institute of Medical Sciences (Patna, Índia)
Marceló et al. 2014	<i>Lu. longipalpis</i>	1995	Colômbia	Instituto Nacional de Saúde, Bogotá, Colômbia
Denlinger et al. 2015	<i>Lu. longipalpis</i>	80s	NI	Universidade de Salt Lake City, Utah, Estados Unidos
	<i>Ph. papatasi</i>	80s	NI	

Cont. da tabela 2. Colônias de flebotomíneos com potencial para Linhagem Referência de Suscetibilidade.

Referência	Espécie	Ano	Origem	Local de criação
Li et al. 2015	<i>Ph. papatasi</i>	NI	Estados Unidos	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, Texas, Estados Unidos
	<i>Ph. duboscqi</i>	NI	Quênia	Unidade de Pesquisa Médica do Exército, Nairóbi, Quênia
Pessoa et al. 2015	<i>Lu. longipalpis</i>	NI	Brasil	Gruta da Lapinha, Minas Gerais. Flebotomíneos de campo
Denlinger et al. 2016	<i>Lu. longipalpis</i>	80s	NI	Universidade de Salt Lake City, Utah, Estados Unidos
	<i>Ph. papatasi</i>	80s	NI	
Fawaz et al. 2016	<i>Ph. papatasi</i>	1994	Egito	Terceira Unidade Naval de Pesquisa Médica dos EUA, Cairo, Egito
Rama et al. 2017**	<i>Ph. argentipes</i>	2014	Índia	Instituto de Pesquisa de Ciências Médicas Memorial Rajendra (Patna, Índia)

Ph. – *Phlebotomus*; Lu. – *Lutzomyia*; NI – Não identificado; \* - Reabastecimento de flebotomíneos; \*\* - Colônia criada a partir de insetos resistentes

**Dose e Tempo Letais de flebotomíneos** - Doses letais e tempos letais estimados por diferentes autores para estudar a suscetibilidade de flebotomíneos de campo a inseticidas podem ser observados nas tabelas 3 e 4. O TL<sub>50</sub> da espécie *Ph. argentipes* variou entre 10 min a 1,28 horas para DDT a 4% (Mukhopadhyay et al. 1992, Chandra et al. 1995, Rama et al. 2017). Para este mesmo produto, *Ph. papatasi* apresentou TL<sub>50</sub> de 16 a 1312 min e TL<sub>90</sub> de 40 min. a 2025 min. Esses valores são baseados em testes com papéis impregnados da OMS (Afshar et al. 2011, Saeidi et al. 2012, 2013, Bidabadi et al. 2017). TL<sub>50</sub> e TL<sub>90</sub> para DDT a 4% da espécie *Ph. sergenti* foi 8 a 12 min. e 32 a 39 min., respectivamente (Afshar et al. 2011, Azamani et al. 2017).

Em relação a espécie *Lu longipalpis*, Santamaria et al. (2003) utilizando teste de garrafas do CDC impregnadas com lambda-cihalotrina (10 ug/garrafa) obtiveram valores de 24 e 60 min para TL<sub>50</sub> e TL<sub>95</sub>, respectivamente. Na Colômbia, grupos de 10 a 15 insetos da espécie *Lu. longipalpis* não alimentadas foram analisadas por meio de garrafas impregnadas do CDC tratadas com 50, 75, 100 e 150 ug/mL de malation; 5, 7, 10, 25 e 45 ug/mL de deltametrina e 3, 5, 10, 15, 25 e 50 ug/mL de lambda-cialotrina. As doses e os tempos diagnósticos foram de 75 ug/mL e 25 min. para malation, de 10 ug/mL e 35 min. para deltametrina e de 15 ug/mL e 30 min. para lambda-cialotrina (Marceló et al. 2014).

No Brasil, machos e fêmeas da espécie *Lu. longipalpis* coletados na Gruta de Lapinha/MG foram expostos a malation (200 uL/garrafa) e fenitrothion (800 uL/garrafa) em testes de garrafa do CDC, cujos valores de TL<sub>50</sub> foram de 20 e 35 min, conforme Alexander et al (2009).

Doses diagnósticas acima de 7.0 ug/mL para Propoxur e Bendiocarb, 7.5 ug/mL para DDT, 4.0 ug/mL para lambda-cialotrina, 20.0 ug/mL para cipermetrina e 15.0 ug/mL para deltametrina foram suficientes para produzir 100% de mortalidade em 40 min. para as espécies *Lu. longipalpis* e *Ph. papatasi* (Denlinger et al. 2016).

**Ensaio de detecção de resistência de flebotomíneos** - O método de tubos e papéis impregnados da OMS é o mais utilizado para avaliação da suscetibilidade de flebotomíneos a inseticida (55 artigos), porém não é o único. Há também o teste de garrafas impregnadas do CDC (6 artigos) e algumas metodologias adaptadas de tubos (3 artigos) e cones da OMS (1 artigo). Dois

critérios de mortalidade são adotados nos estudos. O primeiro refere-se à ausência total e movimentos (Marceló et al. 2014, Denlinger et al. 2015). O segundo considera insetos mortos quando não conseguem ficar de pé ou voar coordenadamente (Dhiman et al. 2003, Singh et al. 2015, Rama et al. 2017).

**Ensaio de parâmetros biológicos de flebotomíneos** - Independentemente do tipo de metodologia adotada, nota-se que não há padronização quanto ao sexo para os testes de suscetibilidade, ou seja, existem estudos que avaliaram apenas flebotomíneos fêmeas (Falcão 1963, Kaul et al. 1994, Dinesh et al. 2010), diferentemente daqueles que usaram apenas machos (Li et al. 2015). Ainda, há aqueles que misturam machos e fêmeas (Hadjinicolaou et al. 1958, Fahmy et al. 1996, Saeidi et al. 2013),

Alguns trabalhos utilizaram populações coletadas diretamente no campo. Após a captura, realizaram procedimentos de aclimatação dos insetos para minimizar possíveis danos físicos que poderiam aumentar o número de insetos mortos, e logo depois, já realizaram os ensaios (Joshi et al. 1979, Singh & Bansal 1996, Singh 2015). Por outro lado, outros testes utilizaram somente com a geração F1 dos insetos de campo (Schmidt & Schmidt 1969, Mukhopadhyay et al. 1992, Hassan et al. 2012).

Existem estudos que comparam o status nutricional dos insetos (Dinesh et al. 2010), ou seja, se a alimentação dos flebotomíneos influencia ou não na capacidade de sobreviver a exposição a inseticida. Também existem trabalhos a respeito da interferência da idade e geração nos experimentos de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas (Fawaz et al. 2016, Rama et al. 2015).

Rama et al. (2015) avaliaram a influência das gerações na suscetibilidade da espécie de *Ph. argentipes* ao DDT, cujo pico de resistência (100%) foi na F4, diminuindo gradualmente até a geração F7.

Tabela 3. Doses letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécie e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida	DL <sub>50</sub>	DL <sub>90</sub>	DL <sub>95</sub>	DL <sub>99</sub>	DD
Hadjinicolaou 1958 (%)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	0,28				
			0,75				
		Dieldrin	0,20				
			0,20				
Falcão 1963 (%)	<i>Lu. longipalpis</i>	DDT	0,55				
		Dieldrin	0,24				
Schmidt & Schmidt 1969 (%)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	1,03				
			0,80				
			0,96				
			1,50				
			1,01				
			0,97				

Cont. da tabela 3. Doses letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécie e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida	DL <sub>50</sub>	DL <sub>90</sub>	DL <sub>95</sub>	DL <sub>99</sub>	DD
Schmidt & Schmidt 1969 (%)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	1,93				
			1,40				
			0,63				
			0,80				
			0,72				
		1,07					
		Dieldrin	1,03				
			0,95				
			0,90				
			0,48				
0,42							
0,47							



Cont. da tabela 3. Doses letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécie e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida	DL <sub>50</sub>	DL <sub>90</sub>	DL <sub>95</sub>	DL <sub>99</sub>	DD
Kaul et al, 1978 (%)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	0,6				
		Dieldrin	0,1				
	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	2-2,8				
		Dieldrin	0,1				
Joshi et al, 1979 (%)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	> 4				
		Dieldrin	0,32				
	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	0,48				
		Dieldrin	0,16				
Pener et al, 1987 (%)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	1,21	2,6			
		Metoxicloro	0,93	4,3			
		Permetrina	0,04	0,08			
Falcão et al, 1988 (%)	<i>Lu. longipalpis</i>	Deltametrina	0,00025				

Cont. da tabela 3. Doses letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécie e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida	DL <sub>50</sub>	DL <sub>90</sub>	DL <sub>95</sub>	DL <sub>99</sub>	DD
Rashti et al 1992 (%)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	2,25				
			1,70				
			3,00				
			2,60				
			2,00				
			0,77				
			1,70				
Singh & Bansal 1996 (%)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	1,23		10,83		
		Dieldrin	0,14		0,62		
Fahmy et al. 1996 (%)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	0,40		2,5		
		Dieldrin	0,12		1,4		
Tetreault et al. 2001 mg Al/mL	<i>Ph. bergeroti</i>	Bendiocarb	0,05	0,105		0,177	

Cont. da tabela 3. Doses letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécie e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida	DL <sub>50</sub>	DL <sub>90</sub>	DL <sub>95</sub>	DL <sub>99</sub>	DD
Tetreault et al, 2001 mg Al/mL	<i>Ph. bergeroti</i>	Ciflutrina	0,04	0,155		0,446	
		DDT	1,10	3,05		6,99	
		Malation	0,40	0,756		1,26	
		Permetrina	0,28	0,565		1,00	
		Resmetrina	0,02	0,067		0,156	
		Bendiocarb	0,12	0,383		0,957	
	<i>Ph. langeroni</i>	Ciflutrina	0,03	0,202		0,823	
		DDT	1,88	6,97		20,25	
		Malation	0,30	0,7		1,38	
		Permetrina	0,28	0,416		0,564	
	<i>Ph. sergenti</i>	Resmetrina	0,12	2,52		-	
		Bendiocarb	0,05	0,095		0,156	

Cont. da tabela 3. Doses letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécie e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida	DL <sub>50</sub>	DL <sub>90</sub>	DL <sub>95</sub>	DL <sub>99</sub>	DD
Tetreault et al, 2001 mg Al/mL	<i>Ph. sergenti</i>	Ciflutrina	0,05	0,113		0,212	
		DDT	3,28	6,27		10,6	
		Malation	0,49	1,23		2,57	
		Permetrina	0,38	0,864		1,66	
		Resmetrina	0,06	0,108		0,162	
	<i>Ph. papatasi</i>	Bendiocarb	0,05	0,103		0,175	
		Ciflutrina	0,03	0,2		0,774	
		DDT	0,94	2,13		4,14	
		Malation	0,54	1,23		2,38	
		Permetrina	0,36	0,63		0,988	
		Resmetrina	0,03	0,13		0,342	
Alvarez et al, 2006 (%)	<i>Lu. evansi</i>	Lambda-cialotrina	0,00041		0,002		

Cont. da tabela 3. Doses letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécie e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida	DL <sub>50</sub>	DL <sub>90</sub>	DL <sub>95</sub>	DL <sub>99</sub>	DD
Alvarez et al, 2006 (%)	<i>Lu. evansi</i>	Fenitroton	0,012		0,052		
		Cipermetrina	8,95	41,85	70,7		
		Deltametrina	0,92	28,7	92,43		
		Lambda-cialotrina	0,23	5	14,21		
		Permetrina	17,06	82,4	140,8		
Denlinger et al, 2015 ug/250 mL	<i>Lu. longipalpis</i>	Clorpirifós	0,45	5,73	13,53		
		Fenitroton	0,34	2,65	5,3		
		Malation	8,43	13,81	16,34		
		Bendiocarb	0,98	38,96	136		
		Propoxur	3,83	75,44	207,8		
		DDT	28,36	218,58	437,7		
	<i>Ph. papatasi</i>	Cipermetrina	8,89	73,27	150		

Cont. da tabela 3. Doses letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécie e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida	DL <sub>50</sub>	DL <sub>90</sub>	DL <sub>95</sub>	DL <sub>99</sub>	DD
Denlinger et al, 2015 ug/250 mL	<i>Ph. papatasi</i>	Deltametrina	9,9	90,24	191,3		
		Lambda-cialotrina	0,26	3,65	8,87		
		Permetrina	41,34	188,57	315,9		
		Clorpirifós	0,32	6,41	17,65		
		Fenitroton	1,36	7,33	13		
		Malation	20,01	77	121,8		
		Bendiocarb	0,28	2,5	5,22		
		Propoxur	5,5	39,13	76,26		
		DDT	15,04	295,97	815,2		
Pessoa et al, 2015 mg/m <sup>2</sup>	<i>Lu. longipalpis</i>	Alfa-cipermetrina	0,78		10,55	31,06	
Denlinger et al, 2016 ug/250 mL	<i>Lu. longipalpis</i>	Clorpirifós					25
							20

Cont. da tabela 3. Doses letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécie e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida	DL <sub>50</sub>	DL <sub>90</sub>	DL <sub>95</sub>	DL <sub>99</sub>	DD	
Denlinger et al. 2016 ug/250 mL	<i>Ph. papatasi</i>	Fenitrothion					32	
		Malation					30	
		Bendiocarb					40	
		Propoxur					6	
		Cipermetrina					5	
		Deltametrina					3	
								2
								20
						10		
						45		
						15		
						5		

Cont. da tabela 3. Doses letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécie e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida	DL <sub>50</sub>	DL <sub>90</sub>	DL <sub>95</sub>	DL <sub>99</sub>	DD
Denlinger et al. 2016 ug/250 mL	<i>Ph. papatasi</i>	Lambda-cialotrina					4
							3
		Lambda-cialotrina					1
		Permetrina					15
		DDT					7,5
Denlinger et al. 2016 ug/250 mL	<i>Ph. papatasi</i>	Clorpirifós					30
		Fenitroton					30
		Malation					130
		Bendiocarb					2
							1
		Propoxur					3
							2



Cont. da tabela 3. Doses letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécie e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida	DL <sub>50</sub>	DL <sub>90</sub>	DL <sub>95</sub>	DL <sub>99</sub>	DD
Denlinger et al. 2016 ug/250 mL	<i>Ph. papatasi</i>	Cipermetrina					95
							65
		Deltametrina					45
							25
		Lambda-cialotrina					15
							5
		Permetrina					4
							2
		DDT					60
							50
					7,5		

Cont. da tabela 3. Doses letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécie e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida	DL <sub>50</sub>	DL <sub>90</sub>	DL <sub>95</sub>	DL <sub>99</sub>	DD
Karakus et al. 2016 (%)	<i>Ph. tobbi</i>	Deltametrina	0,002	0,027	0,184		0,368
	<i>Ph. papatasi</i>						
	<i>Ph. perfiliewi</i>						
	<i>Ph. major</i>	Permetrina	0,007	0,238	0,450		0,9
	<i>Se. Dentata</i>						

Nota: DL – Dose letal; DD – Dose diagnóstica; *Ph* – *Phlebotomus*; *Lu* – *Lutzomyia*; *Se* – *Sergentomyia*.

Tabela 4. Tempos letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécies e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Mukhopadhyay et al. 1992	<i>Ph. argentipes</i>	DDT - 4%	76,8	214,2		
		DDT - 4%	10,6			
Chandra et al. 1995	<i>Ph. argentipes</i>	Dieldrin - 0,4%	10,2			
		Malation - 5%	2,8			
Fahmy et al. 1996	<i>Ph. papatasi</i>	Malation - 5%	3,9		19	
			1,4		14	
		Propoxur - 0,1%	8,4		29	
			3,4		25	
		Deltametrina - 0,025%	1,65		10	
			1,7		14,00	
		Permetrina - 0,25%	3		13,00	
	3		31			

Cont. da tabela 4. Tempos letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécies e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Singh & Bansal 1996	<i>Ph. papatasi</i>	Malation	19		55,3	
		Fenitroton	22,3		43,7	
		Propoxur	22		57,8	
Maroli et al. 2002	<i>Ph. perniciosus</i>	DDT - 4%	19,9		160,7	
		Lambda-cialotrina - 0,06%	3,2		62,4	
		Permetrina - 0,2%	6,9		126,5	
	<i>Ph. papatasi</i>	DDT - 2%	18		127,7	
		Lambda-cialotrina - 0,06%	7,4		65,8	
		Permetrina - 0,2%	11		50,2	
<i>Ph. papatasi</i> <i>colônia</i>	DDT - 2%	16,6		143,2		
	Lambda-cialotrina - 0,06%	4,9		43,5		
		Permetrina - 0,2%	7,8		258,3	

Cont. da tabela 4. Tempos letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécies e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Santamaria et al. 2003	<i>Lu. longipalpis</i>	Lambda-cialotrina - 10ug/mL	24		60	
			30			
		Fenitrotion - 40 uL/L	-			
			45			
			35			
Alexander et al. 2009	<i>Lu. longipalpis</i>	Malation - 10uL/L	15			
			20			
			20			
		Permetrina - 0,10%	45			
			25			
			60			

Cont. da tabela 4. Tempos letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécies e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Alexander et al. 2009	<i>Lu. longipalpis</i>	Permetrina - 0,10%	25			
			60			
		Permetrina - 0,05%	30			
			40			
		Lambda-cialotrina - 0,05%	25			
			25			
Afshar et al. 2011	<i>Ph. papatasi</i>	DDT - 4%	16	40		
			20	55		
		Permetrina - 0,05%	26	97		
			10	29		
			13	41		

Cont. da tabela 4. Tempos letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécies e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Afshar et al. 2011	<i>Ph. papatasi</i>	Permetrina - 0,05%	17	73		
			8	32		
	<i>Ph. sergenti</i>	DDT - 4%	21	76		
			115	-		
		Permetrina - 0,05%	14	38		
			17	51		
Saeidi et al. 2012	<i>Ph. papatasi</i>	DDT - 4%	22	82		
			711,09	2025		
			1104,97	3531,45		
		Permetrina - 0,75%	1879,25	15418,4		
			973,51	8864,77		

Cont. da tabela 4. Tempos letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécies e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Saeidi et al. 2012	<i>Ph. papatasi</i>		182,35	637,3		
			207,39	821		
		Permetrina - 0,75%	40,26	424		
			59,5	799,45		
			86,29	2299,1		
			19,37	238,7		
			26,79	315,03		
			Permetrina - 0,1%	34,79	447,2	
		0,665		42,54		
			4,4	80,29		
9,32	329,63					
		Ciflutrina - 0,15%	10,05	147,39		



Cont. da tabela 4. Tempos letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécies e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Saeidi et al. 2012	<i>Ph. papatasi</i>	Ciflutrina - 0,15%	15,42	202		
			20,94	315		
			0	54,75		
			2,65	117,56		
			11,07	8046,56		
			0,71	35,62		
			1,48	44,8		
			2,48	58,14		
			0	9,2		
			1,5	30,3		
			6,03	231,37		
Saeidi et al. 2013	<i>Ph. papatasi</i>	DDT- 4%	1312,66			

Cont. da tabela 4. Tempos letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécies e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Saeidi et al. 2013	<i>Ph. papatasi</i>	DDT- 4%	1200,97			
		Permetrina - 0,75%	253,66			
			310,1			
		Permetrina - 0,1%	36,47			
			18,63			
		Ciflutrina - 0,15%	9,38			
			6,08			
Marceló et al. 2014	<i>Lu. longipalpis</i>	Lambda-cialotrina - 0,05%	1			
			1			
		Malation - 50-150 ug/mL	12		23	25
		Permetrina - 5-45 ug/mL	15		35	35
		Lambda-cialotrina - 3,5-50 ug/mL	14		27	30

Cont. da tabela 4. Tempos letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécies e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Li et al. 2015	<i>Ph. papatasi</i>		30			
		Cipermetrina - 0,01-0,00001%	21,1			
			<20			
			29,9			
		Permetrina - 0,01-0,00001%	<20			
			-			
			32,1			
		Ciflutrina - 0,01-0,00001%	16,5			
			-			
			12,8			
	Lambda-cialotrina - 0,01-0,00001%	<10				
		-				

Cont. da tabela 4. Tempos letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécies e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Li et al. 2015	<i>Ph. papatasi</i>		85,9			
		Permetrina - 0,01-0,00001%	34,2			
			14,2			
			13,8			
		Praletrina - 0,01-0,00001%	<10			
			-			
			53,1			
		Clorpirifós - 0,01-0,00001%	28,3			
			-			
			77,6			
	Coumafós - 0,01-0,00001%	34,7				
		-				

Cont. da tabela 4. Tempos letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécies e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Li et al. 2015	<i>Ph. papatasi</i>		53,4			
		Diazinon - 0,01-0,00001%	25,5			
			-			
			122			
		Diclovós - 0,01-0,00001%	58,4			
	<i>Ph. duboscqi</i>		-			
			109,2			
		Cipermetrina - 0,01-0,00001%	24,1			
			<10			
		Permetrina - 0,01-0,00001%	20,2			
		<10				

Cont. da tabela 4. Tempos letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécies e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Li et al. 2015	<i>Ph. duboscqi</i>		25			
		Etofenprox - 0,01-0,00001%	32,5			
			17,9			
			65,3			
		Lambda-cialotrina - 0,01-0,00001%	<20			
			<5			
			80,8			
		Permetrina - 0,01-0,00001%	33,1			
			<20			
			22,4			
	Praletrina - 0,01-0,00001%	<10				
		<5				

Cont. da tabela 4. Tempos letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécies e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Li et al. 2015	<i>Ph. duboscqi</i>	Carbaril - 0,01-0,00001%	32,2			
			-			
		Clorpirifós - 0,01-0,00001%	26,8			
			21,4			
			<10			
			<10			
		Malation - 0,01-0,00001%	-			
			13,1			
Denlinger et al. 2016	<i>Lu. longipalpis</i>	Clorpirifós - 5-30 ug/250 mL				30
						45
		Fenitrothion - 2-32 ug/250 mL				45

Cont. da tabela 4. Tempos letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécies e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Denlinger et al. 2016	<i>Lu. longipalpis</i>	Fenitrothion - 2-32 ug/250 mL				60
		Malation - 5-45 ug/250 mL				60
		Bendiocarb - 1-8 ug/250 mL				40
						60
		Propoxur - 1-10 ug/250 mL				30
						35
		Cipermetrina - 5-20 ug/250 mL				40
						60
Permetrina - 5-100 ug/250 mL				35		
				40		
Lambda-cialotrina - 1-40 ug/250 mL				60		
				40		



Cont. da tabela 4. Tempos letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécies e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)	
Denlinger et al. 2016	<i>Lu. longipalpis</i>	Lambda-cialotrina - 1-40 ug/250 mL				45	
						60	
		Permetrina - 5-20 ug/250 mL				30	
		DDT - 2,5-700 ug/250 mL				30	
		Clorpirifós - 20-45 ug/250 mL				60	
		<i>Ph. papatasi</i>	Fenitrotion - 4-45 ug/250 mL				60
			Malation - 50-145 ug/250 mL				60
							30
			Bendiocarb - 1-6 ug/250 mL				40
							30
		Propoxur - 1-15 ug/250 mL				35	
		Cipermetrina - 20-95 ug/250 mL				45	

Cont. da tabela 4. Tempos letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécies e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Denlinger et al. 2016	<i>Ph. papatasi</i>	Cipermetrina - 20-95 ug/250 mL				60
						35
		Permetrina - 5-100 ug/250 mL				40
						45
		Lambda-cialotrina - 1-40 ug/250 mL				60
						40
						60
Permetrina - 10-50 ug/250 mL				40		
				60		
				30		
Azamani et al. 2017	<i>Ph. sergenti</i>	DDT - 4%	12,80	39,63		
			15,37	51,09		

Cont. da tabela 4. Tempos letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécies e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Azamani et al. 2017	<i>Ph. sergenti</i>	Bendiocarb - 0,1%	18,33	73,14		
			16,47	39,63		
			19,15	47,4		
			40,62	60,98		
			4,47	14,15		
			6,31	18,56		
Rama et al. 2017	<i>Ph. argentipes</i>	DDT - 4%	8,13	27,71		
			60,33	128,04	133	
			282,36	389	472,07	
Bidabadi et al. 2017	<i>Ph. papatasi</i>	DDT - 4%	164,08	990,08		
			584,44	2631,11		
			3819,86	30412256,7		

Cont. da tabela 4. Tempos letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécies e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
			-	-		
		DDT - 4%	564,07	10602,31		
			-	-		
			53,54	6754,81		
			110,1	44791,73		
Bidabadi et al. 2017	<i>Ph. papatasi</i>	Permetrina - 0,75%	220,25	5094966,88		
			-	-		
			38,08	1462,91		
			-	-		
			3,32	98,64		
		Permetrina - 0,05%	11,64	274,31		
			26,79	2515,6		

Cont. da tabela 4. Tempos letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécies e inseticida.

Referência	Espécie	Inseticida - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)	
Bidabadi et al. 2017	<i>Ph. papatasi</i>	Permetrina - 0,05%	0,25	151,83			
			1,95	440,87			
			5,41	3914,76			
			0,41	106,84			
			1,53	281,05			
			3,34	1630,87			
		Ciflutrina - 0,15%	0,04	11,54			
			0,6	25,34			
			1,72	122,78			
			0,0029	195,81			
			Lambda-cialotrina - 0,05%	16,91	928,8		
				51,04	-		

Cont. da tabela 4. Tempos letais e diagnósticas encontradas nas avaliações de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, por espécies e inseticida.

<b>Referência</b>	<b>Espécie</b>	<b>Inseticida - Dose</b>	<b>TL<sub>50</sub> (min)</b>	<b>TL<sub>90</sub> (min)</b>	<b>TL<sub>95</sub> (min)</b>	<b>TD (min)</b>
			1,88	246,19		
Bidabadi et al. 2017	<i>Ph. papatasi</i>	Lambda-cialotrina - 0,05%	9,78	804,27		
			19,82	25375,72		

Nota: TL – Tempo letal; TD – Tempo diagnóstico; *Ph* - *Phlebotomus*; *Lu* – *Lutzomyia*

## 5.2 Análise dos parâmetros biológicos de idade, sexo e estado nutricional

As curvas de sobrevivência de Kaplan-Meyer apresentam a mortalidade dos flebotômíneos expostos ao longo do tempo por meio dos bioensaios de garrafas do CDC e de cone da OMS.

Os resultados obtidos com a metodologia de garrafas mostraram influência da dieta na mortalidade dos flebotômíneos. As fêmeas alimentadas com sangue foram mais suscetíveis, quando comparadas às fêmeas alimentadas apenas com solução açucarada ( $X^2 = 7,86$ ;  $p = 0,001$ ) (Figura 16).

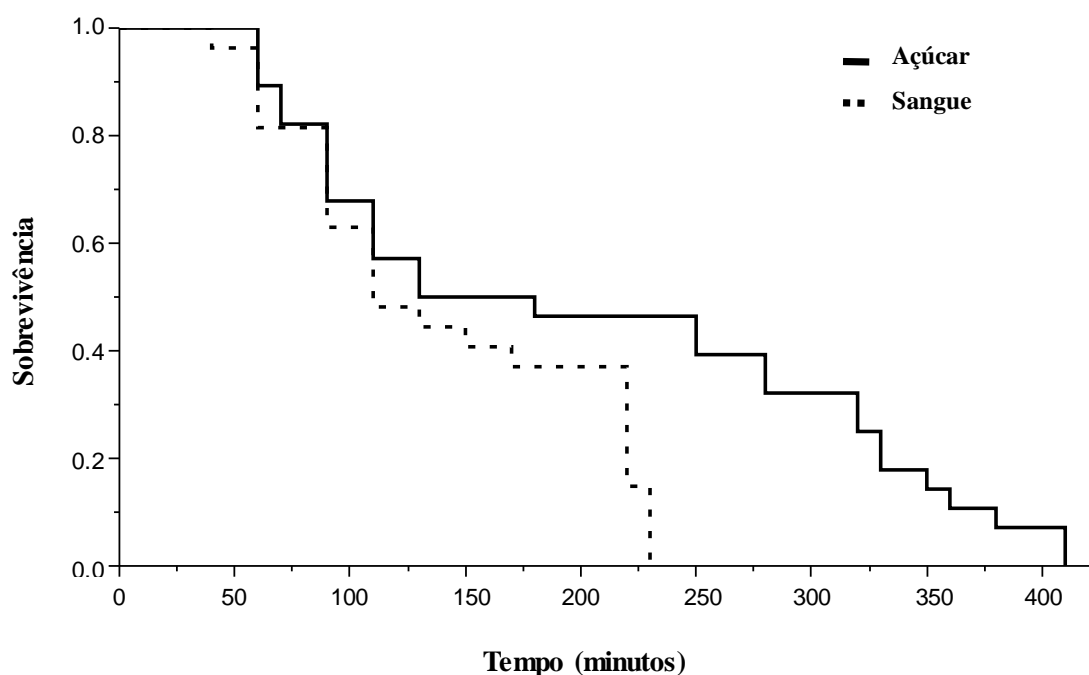


Figura 16. Curvas de sobrevivência, de Kaplan-Meyer, da espécie *Lu. longipalpis* submetidas ao bioensaio de garrafas do CDC, conforme dieta ao inseticida alfacipermetrina a 3  $\mu\text{g/mL}$ .

As avaliações do sexo dos flebotômíneos e das idades, três e cinco dias, não apontaram diferenças significativas ( $X^2 = 0,45$ ;  $p = 0,501$  e  $X^2 = 0,02$ ;  $p = 0,880$ , respectivamente) (Figuras 17 e 18).

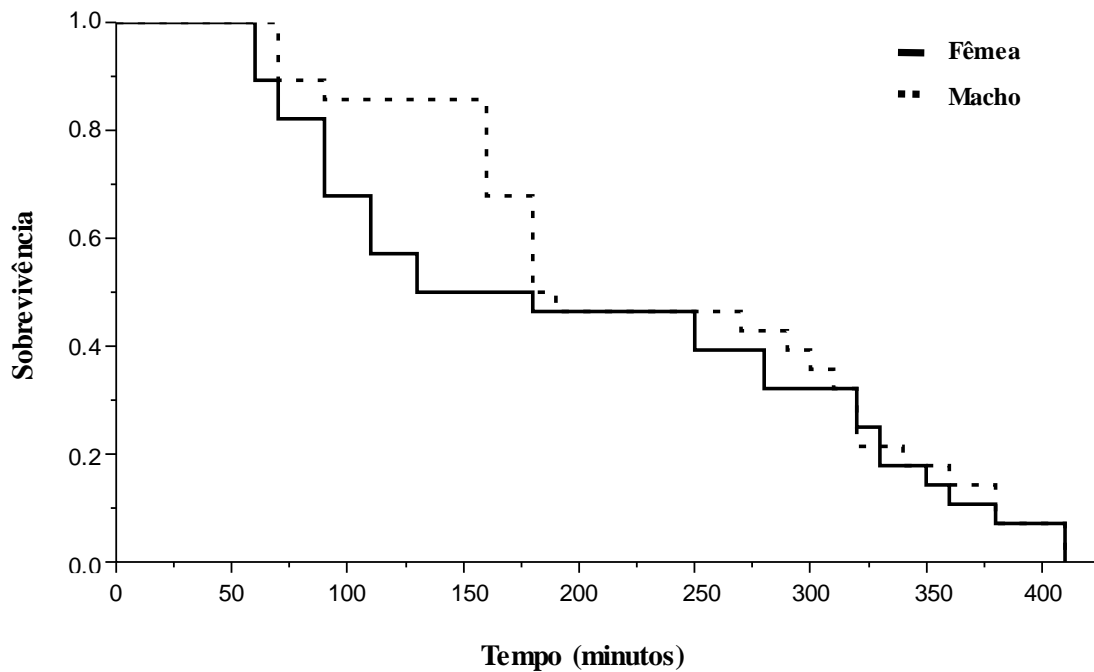


Figura 17. Curvas de sobrevivência, de Kaplan-Meyer, da espécie *Lu. longipalpis* submetidas ao bioensaio de garrafas do CDC, conforme sexo ao inseticida alfacipermetrina a 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

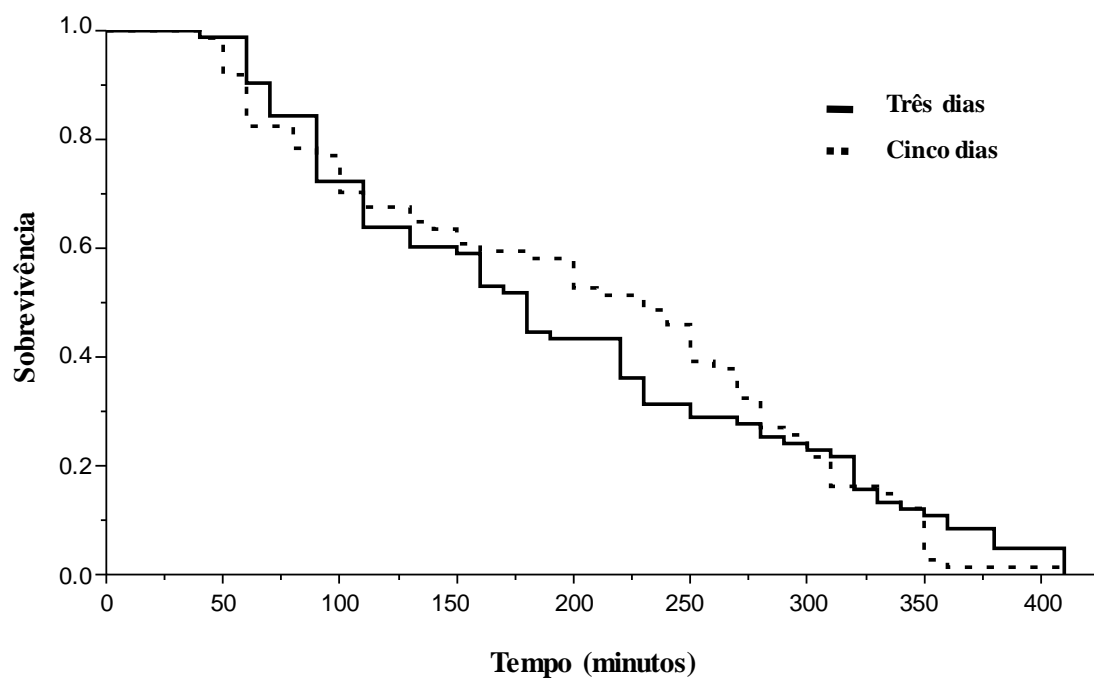


Figura 18. Curvas de sobrevivência, de Kaplan-Meyer, da espécie *Lu. longipalpis* submetidas ao bioensaio de garrafas do CDC, conforme idade ao inseticida alfacipermetrina a 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



Os bioensaios com cones demonstraram não haver diferença entre as dietas ( $X^2 = 1,41$ ;  $p = 0,22$ ) (Figura 19) e os sexos ( $X^2 = 0,27$ ;  $p = 0,59$ ) dos flebotomíneos (Figura 20). No entanto, houve diferença significativa quando comparadas as idades. Os flebotomíneos com cinco dias de idade foram mais suscetíveis do que os flebotomíneos com três dias ( $p = 0,001$ ) (Figura 21).

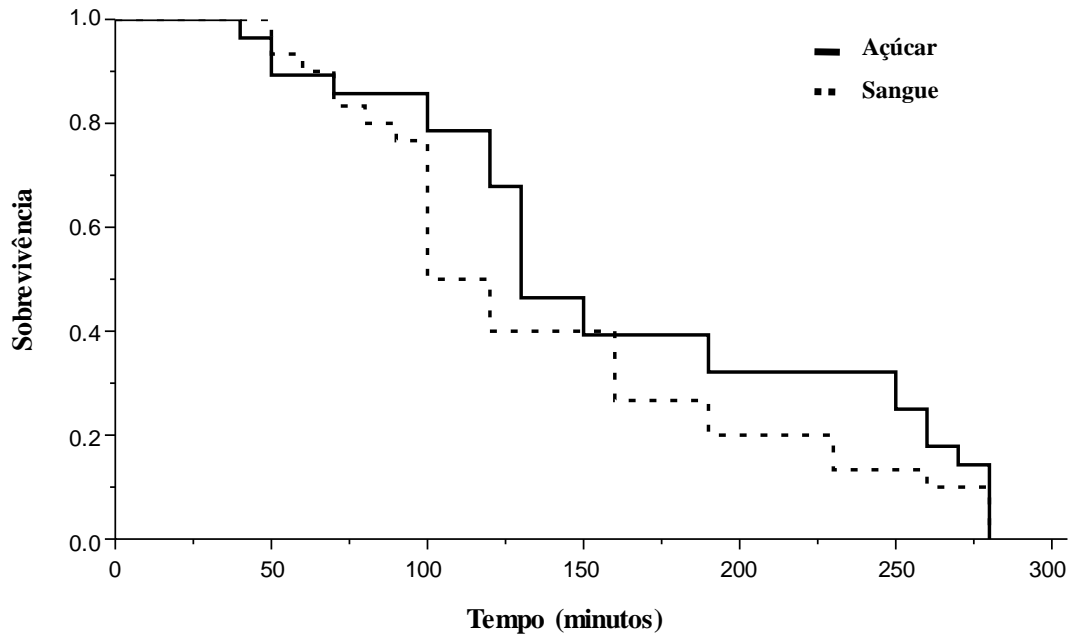


Figura 19. Curvas de sobrevivência, de Kaplan-Meyer, da espécie *Lu. longipalpis* submetidas ao bioensaio de cones, conforme dieta ao inseticida alfacipermetrina a 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

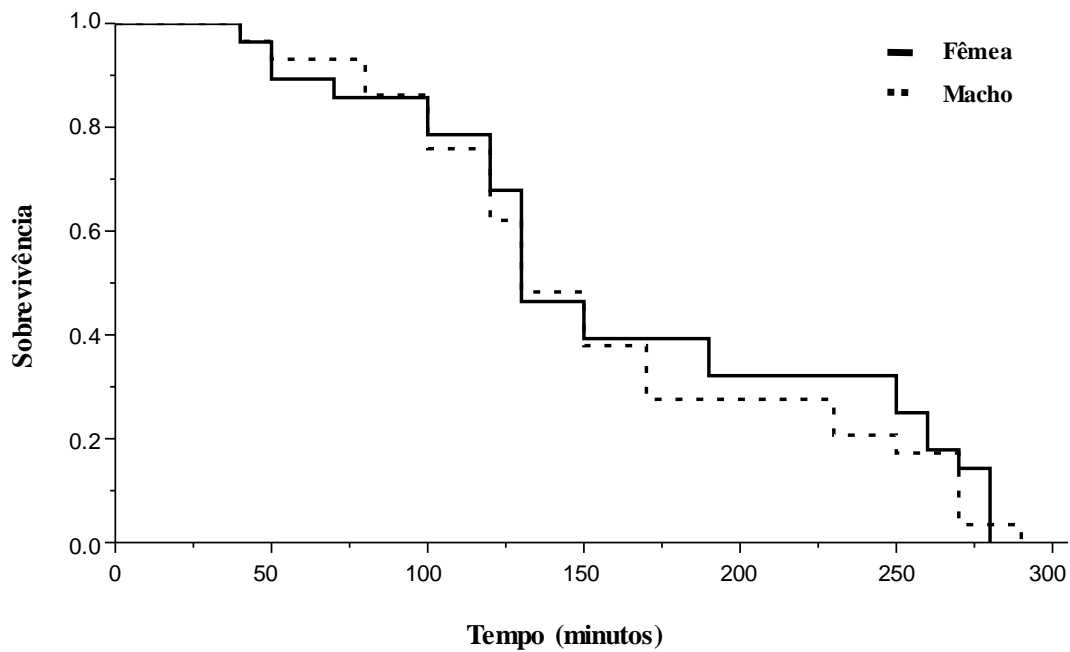


Figura 20. Curvas de sobrevivência, de Kaplan-Meyer, da espécie *Lu. longipalpis* submetidas ao bioensaio de cones, conforme sexo ao inseticida alfacipermetrina a 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

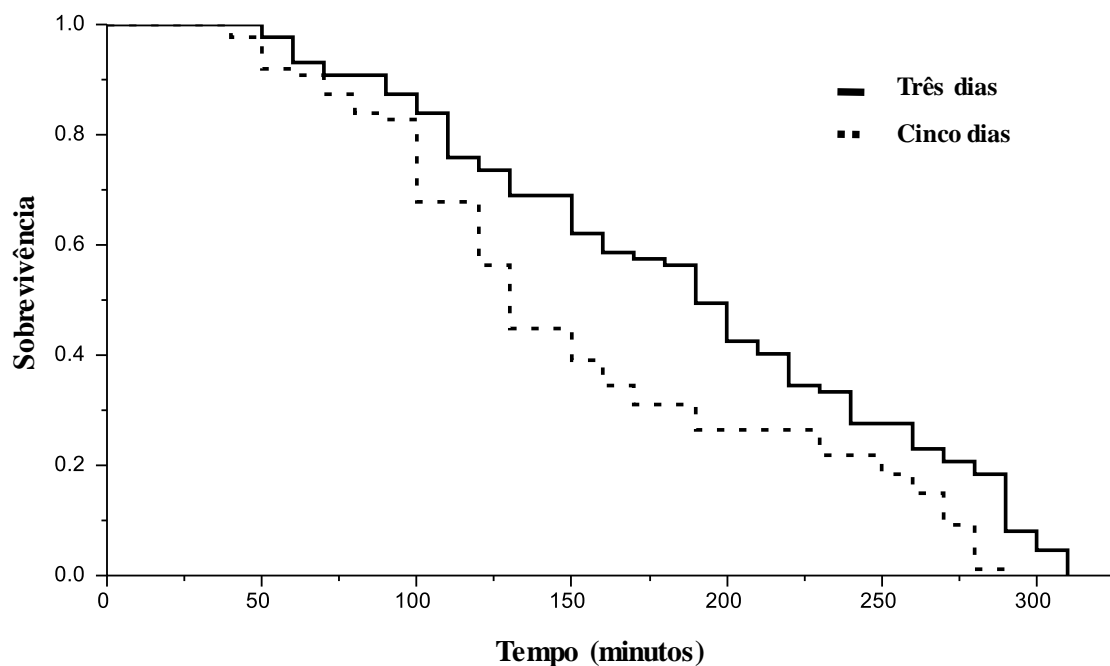


Figura 21. Curvas de sobrevivência, de Kaplan-Meyer, da espécie *Lu. longipalpis* submetidas ao bioensaio de cones, conforme idade ao inseticida alfacipermetrina a 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### 5.3 Determinação de Linhagem Referência de Suscetibilidade

A avaliação das curvas de sobrevivência de KM dos flebotomíneos de Jacobina/BA, Montes Claros/MG e Teresina/PI nos bioensaios de garrafas (Figura 22) e de cones (Figura 23) demonstraram diferença significativa. Os flebotomíneos oriundos de Jacobina se mostraram mais suscetíveis do que os flebotomíneos de Teresina e Montes Claros no bioensaio de garrafa do CDC ( $p = 0.000$ ) e no bioensaio de cone da OMS ( $p = 0.006$ ) para alfacipermetrina na concentração de 3 ug/mL.

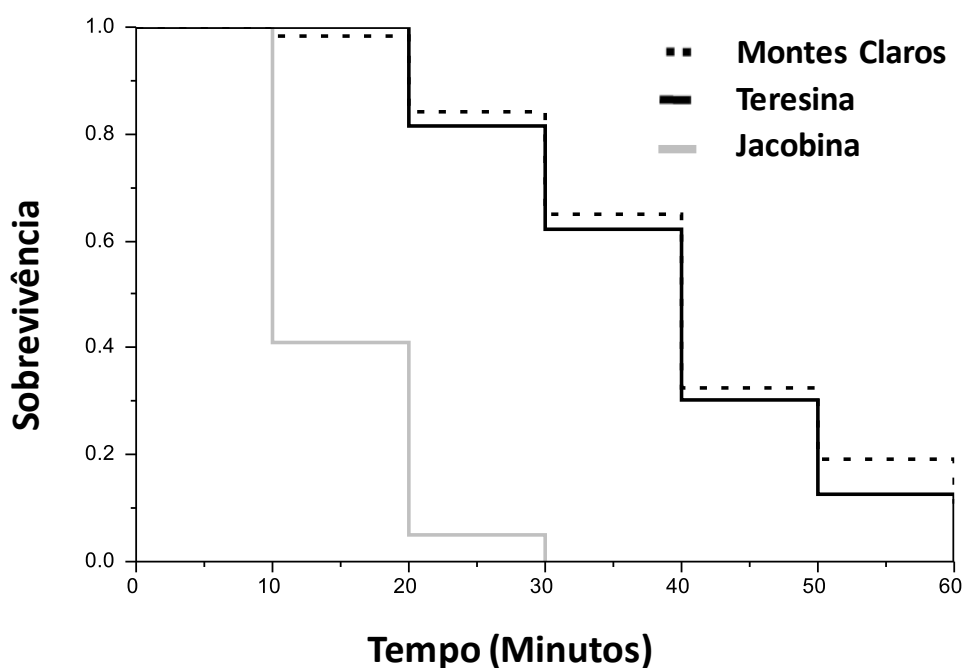


Figura 22. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier das populações de flebotomíneos de Jacobina, Teresina e Montes Claros com a metodologia de garrafas do CDC.

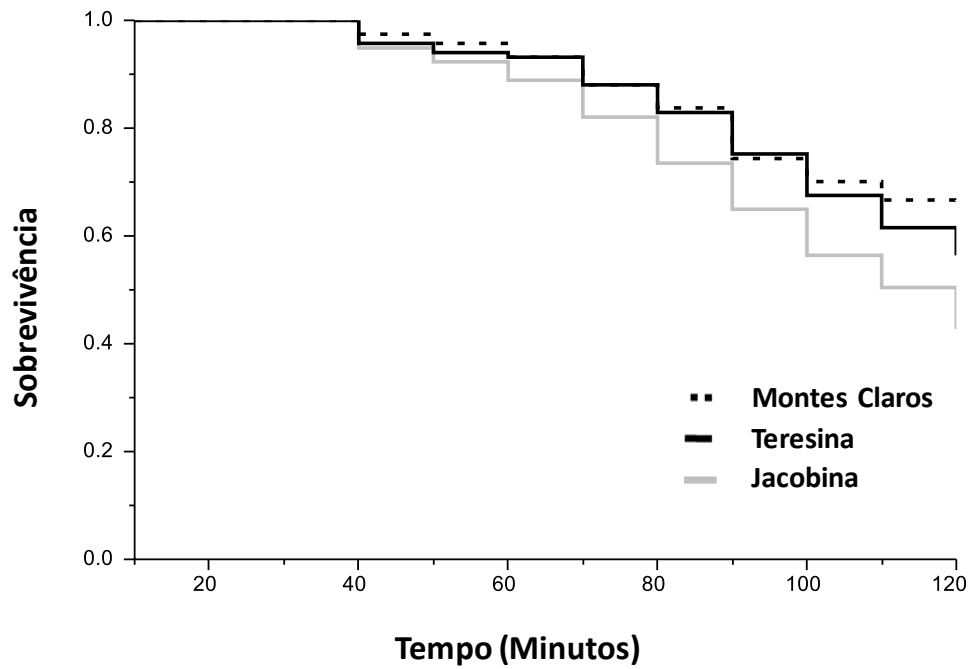


Figura 23. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier das populações de flebotomíneos de Jacobina, Teresina e Montes Claros com a metodologia de cones.

Os valores de  $TL_{50}$ ,  $TL_{90}$  e  $TL_{95}$  para as populações de Jacobina, Teresina e Montes Claros nos bioensaio de garrafas e de cones são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Estimativas de TL<sub>50</sub>, TL<sub>90</sub> e TL<sub>95</sub> para as populações de flebotomíneos de Jacobina, Teresina e Montes Claros com a metodologia de garrafas e cones.

População	n	TL <sub>50</sub> (IC 95%)	TL <sub>90</sub> (IC 95%)	TL <sub>95</sub> (IC 95%)
Garrafa				
Jacobina	120	14,53 (13,15 - 15,67)	22,60 (20,93 - 24,40)	24,97 (23,01 - 27,09)
Teresina	120	38,74 (36,42 - 41,21)	55,00 (52,05 - 58,12)	59,39 (55,96 - 63,03)
Montes Claros	120	40,21 (37,52 - 43,09)	59,64 (55,75 - 63,80)	65,02 (60,40 - 70,01)
Cone				
Jacobina	120	112,59 (104,37 - 121,46)	164,64 (147,12 - 184,24)	178,94 (157,68 - 203,05)
Teresina	120	127,50 (116,42 - 139,64)	186,33 (160,08 - 216,97)	202,48 (170,87 - 239,95)
Montes Claros	120	143,49 (125,62 - 163,91)	224,42 (178,67 - 281,88)	247,53 (192,19 - 318,81)

## 5.4 Análise dos parâmetros metodológicos

### 5.4.1 Diluentes

A análise de álcool e acetona no bioensaio de garrafas não mostrou diferenças significativas quando avaliados com três ( $X^2 = 1,01$  e  $p = 0,313$ ) e com 24 horas de exposição ( $X^2 = 0,88$  e  $p = 0,347$ ) (Figura 24).

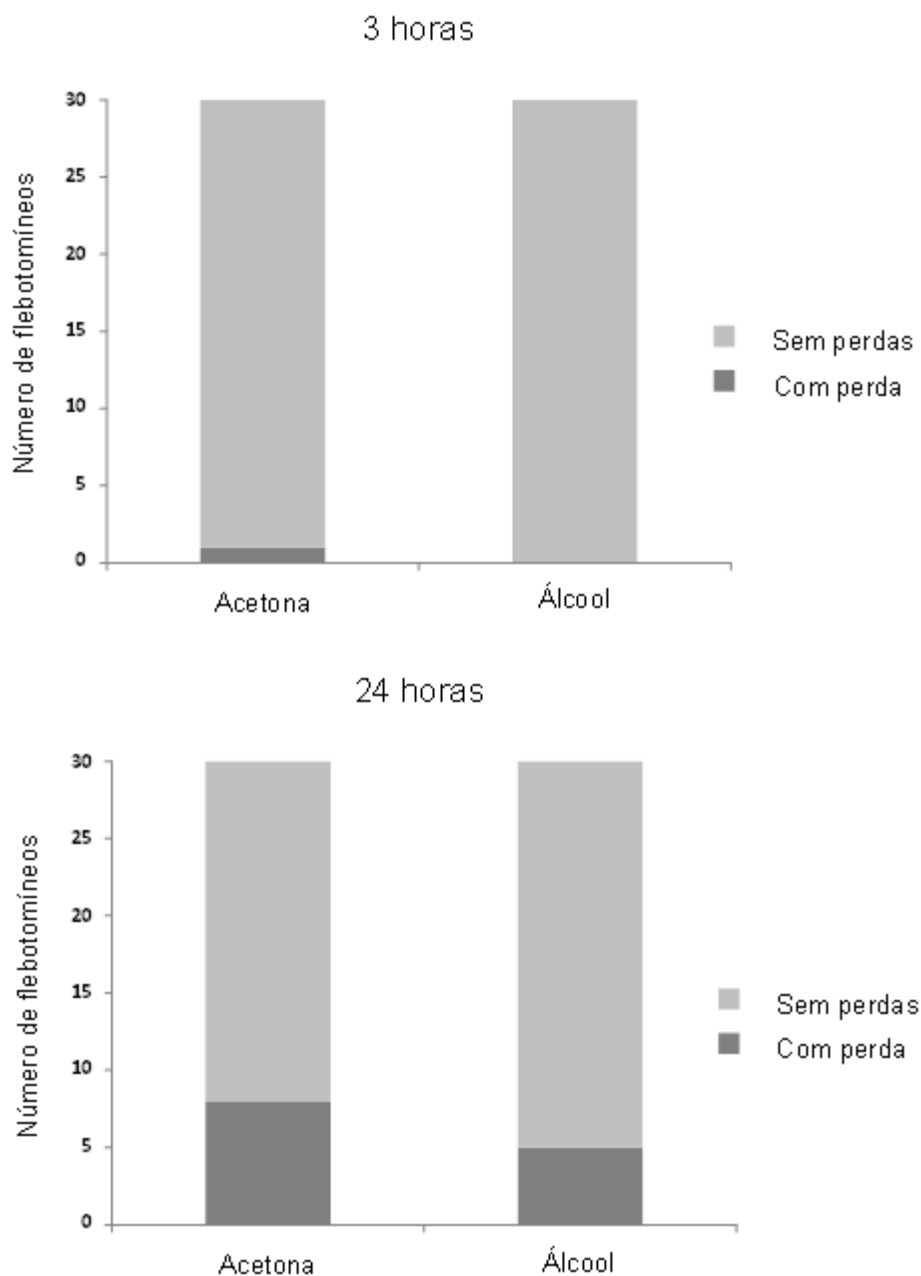


Figura 24. Análise de diluentes, com a metodologia de garrafas do CDC, na avaliação da mortalidade de flebotomíneos.

#### 5.4.2 Análise dos critérios de mortalidade na suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas

Os dois critérios de mortalidade descritos na literatura foram avaliados. De acordo com o critério A (incapacidade de voar e ou ficar de pé), os flebotomíneos alcançaram TL<sub>50</sub> com 22,33 e 26,36 minutos, TL<sub>90</sub> com 30,39 e 33,59 minutos e TL<sub>95</sub> com 32,51 e 35,42 minutos. Para o critério B (ausência total de movimentos), o TL<sub>50</sub> foi de 114,57 e 117,32 minutos, TL<sub>90</sub> de 177,48 e 203,53 minutos e TL<sub>95</sub> de 195,35 e 229,6 minutos (Tabela 6).

Tabela 6. Mortalidade dos flebotomíneos de acordo com dois critérios de mortalidade, expostos a 3 µg/mL de alfacipermetrina na metodologia de garrafas do CDC.

Insetos expostos	n	TL <sub>50</sub> (IC 95%)	TL <sub>90</sub> (IC 95%)	TL <sub>95</sub> (IC 95%)
<b>Critério A</b>				
<b>Machos</b>	30	26,36 (25,09 - 27,98)	33,59 (31,03 - 35,79)	35,42 (33,76 - 37,66)
<b>Fêmeas</b>	30	22,33 (21,01 - 24,88)	30,39 (28,25 - 32,96)	32,51 (30,28 - 35,02)
<b>Critério B</b>				
<b>Machos</b>	30	117,32 (110,10 - 125,00)	203,53 (182,94 - 224,77)	229,65 (203,58 - 259,49)
<b>Fêmeas</b>	30	114,57 (107,88 - 122,54)	117,48 (109,98 - 123,59)	195,35 (176,55 - 214,86)

#### 5.5 Análise da perda de pernas dos flebotomíneos na suscetibilidade a inseticida

Na comparação entre bioensaios de garrafa e de cone com inseticida alfacipermetrina foi possível observar um valor de  $X^2$  de 16,59 e  $p < 0,01$  (Figura 25). Esse resultado demonstra que perda de pernas está associada ao bioensaio de garrafa com alfacipermetrina. Em relação, aos bioensaios de garrafa e de cone com inseticida bendiocarb nota-se um valor de  $X^2$  de 10,41 e  $p = 0,001$ , demonstrando que a perda de pernas está estatisticamente associada a exposição de bendiocarb na metodologia de cone.

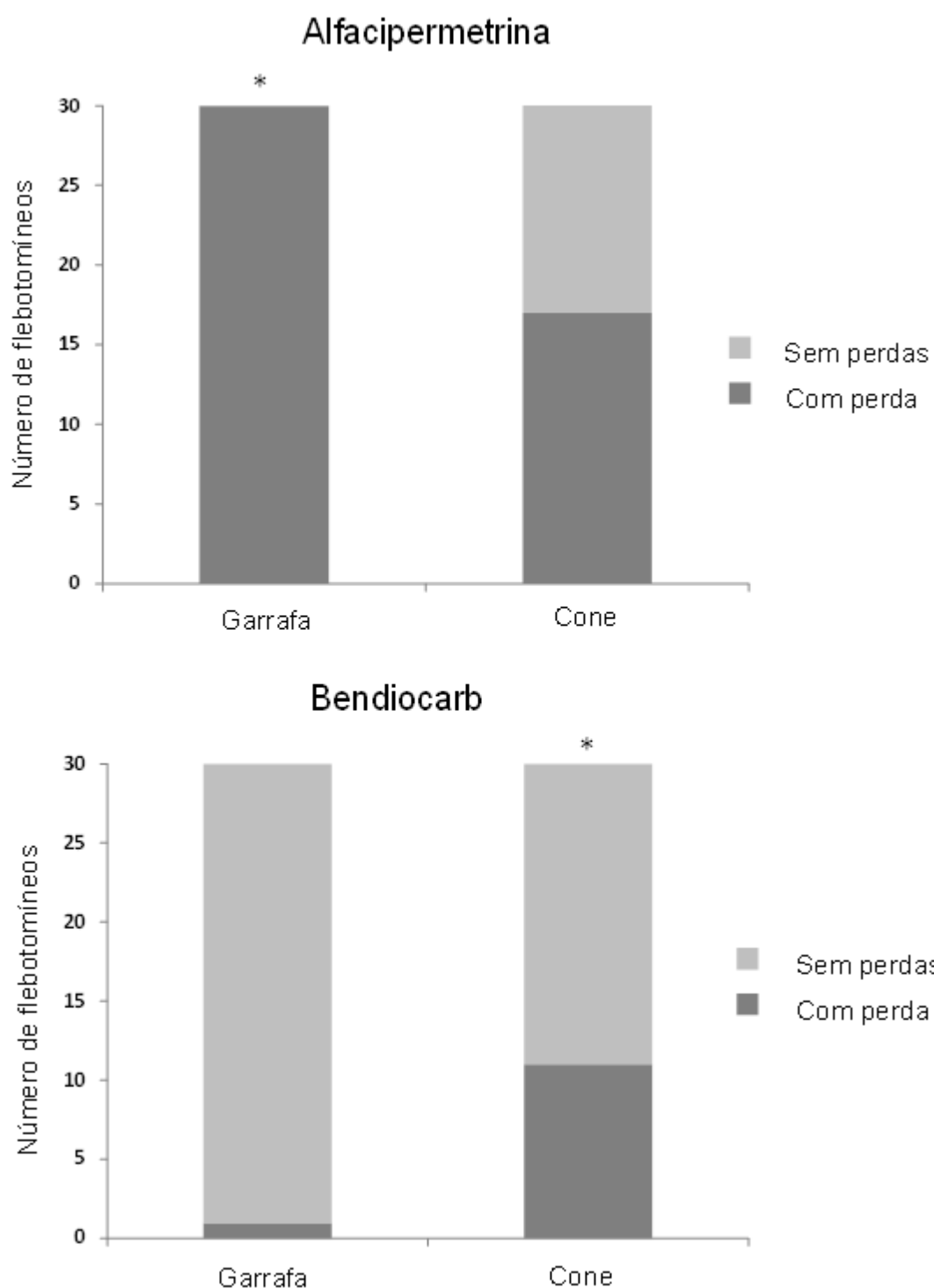


Figura 25. Avaliação da perda de pernas dos flebotomíneos por meio da avaliação do piretróide alfacipermetrina e do carbamato bendiocarb nos métodos de garrafas e cones.

Nota: \*Apresentou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).



A análise dos grupos G2 (submetidos ao bioensaio com garrafas impregnadas com acetona), G3 (submetidos ao bioensaio com garrafas sem presença de diluente e inseticida) e G4 (submetidos diretamente à gaiola) demonstrou que nenhum flebotomíneo perdeu pernas e todos se deslocaram até as fontes alimentares e comeram. Porém, em G1 todos os flebotomíneos perderam pernas (uma a seis) e nenhuma fêmea conseguiu se alimentar. Apenas duas fêmeas alcançaram o hamster, contudo não se alimentaram (uma com dois minutos e outra com 22 minutos de teste). Assim como as fêmeas, os machos também não se alimentaram, embora tenham conseguido voar de forma descoordenada e pousar de forma desequilibrada ( $X^2 = 108,13$ ;  $p < 0,001$ ) (Tabela 7).

Tabela 7. Impacto da perda de pernas dos flebotomíneos na alimentação após exposição à alfacipermetrina a 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e acetona com a metodologia de garrafa do CDC.

<b>Teste <math>X^2</math></b>			
	<b>Se alimentaram</b>	<b>Não se alimentaram</b>	<b>Total</b>
<b>G1</b>	1 (23,50) (21,54)	31 (8,50) (59,56)	n = 32
<b>G2</b>	31 (23,50) (2,39)	1 (8,50) (6,62)	n = 32
<b>G3</b>	31 (23,50) (2,39)	1 (8,50) (6,62)	n = 32
<b>G4</b>	31 (23,50) (2,39)	1 (8,50) (6,62)	n = 32
<b>Total</b>	n = 94	n = 34	n = 128

## 6. DISCUSSÃO

Até dezembro de 2019, foram detectadas 47 populações de Phlebotominae com resistência confirmada, principalmente na Índia. Além disso, dos 61 estudos avaliados sistematicamente, apenas três trabalhos realizaram comparações entre os flebotomíneos de campo e flebotomíneos de colônia. Observa-se também, que as doses e tempos letais usados nos estudos são muito variados. Ademais, o método kit da OMS com papéis impregnados é o mais utilizado para avaliação da suscetibilidade de flebotomíneos a inseticida (Tabela 1). As três últimas contribuições revelam que não existe um protocolo específico de avaliação de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas.

*Phlebotomus argentipes* - vetora de *Leishmania donovani*, agente etiológico da leishmaniose visceral no subcontinente indiano, apresentou 31 registros de resistência a três classes de inseticidas, organoclorado (DDT), organofosforado (Malation) e piretróides (Permetrina e Deltametrina), e outros 19 registros de tolerância. Já a espécie *Ph. papatasi* - vetora de *Leishmania major*, agente etiológico da leishmaniose cutânea zoonótica no Velho Mundo, possui 23 registros de resistência para as quatro classes de inseticida, organoclorado (DDT e Dieldrin), organofosforados (Malation), piretróides (Permetrina e Lambda-cialotrina) e carbamato (Propoxur), e 5 de tolerância aos principais inseticidas utilizados no controle das leishmanioses. A resistência de *Ph. papatasi* ao DDT é devida a sobreposição com a áreas de malária, cujo controle é realizado, desde a década de 40 (Hadjinicolaou 1958), enquanto que a resistência de *Ph. argentipes* é atribuída ao uso indiscriminado de DDT em aplicações residuais intradomiciliares (Ostyn et al. 2008). Além disso, há ainda o relato de resistência da espécie *Sergentomyia shorttii* - espécie sem importância médica. *Ph. sergenti* - vetor de *Le. tropica*, agente etiológico da leishmaniose cutânea antroponótica no Velho Mundo e o flebotomíneo *Lu. longipalpis* - vetor de *Le. infantum*, agente etiológico da

leishmaniose visceral no Novo Mundo, se mostraram tolerantes nos testes de suscetibilidade (Azamani et al. 2017, Alexander et al. 2009).

Até o momento, existe apenas um protocolo para avaliação de suscetibilidade de flebotomíneos preconizado pela OMS (1981b) com kits de papéis impregnados da OMS. Essa metodologia apresenta limitações (ver abaixo) e não utiliza uma Linhagem Referência de Suscetibilidade (LRS). Um dos grandes obstáculos para o desenvolvimento de estudos de suscetibilidade/resistência a inseticidas tem sido determinar uma LRS que possa ser utilizada de forma ampla e padronizada.

De acordo com os resultados das figuras 21 e 22, e da tabela 7, a evidência de alta suscetibilidade de *Lu. longipalpis* de Jacobina-BA pode resolver esse grande obstáculo que é a determinação de uma linhagem suscetível que possa ser utilizada como referência no Brasil. Esta população se mostrou significativamente mais suscetível do que a população de Teresina-PI e do que a população de campo oriunda de Montes Claros-MG.

A partir da adoção de uma LRS, ferramentas essenciais para o monitoramento de populações de flebotomíneos de campo podem ser aprimoradas. Atualmente as concentrações de inseticidas utilizadas para detecção de resistência de flebotomíneos são as mesmas utilizadas para monitoramento de mosquitos (WHO 1998). Com uma população de referência será possível determinar essas doses para flebotomíneos assim como delimitar pontos de corte para confirmação de resistência.

Com a determinação de LRS, será possível avaliar populações de campo por meio da Razão de Resistência (RR). A RR é extremamente útil para monitorar a evolução da resistência a inseticidas em uma população de campo. Esta, é calculada por meio da divisão da  $DL_{50}$  ou  $TL_{50}$  de populações de campo pela  $DL_{50}$  ou  $TL_{50}$  da LRS. Para triatomíneos uma RR maior que cinco implica resistência da população testada (Obara et al. 2011), enquanto que para classificar a resistência em mosquitos como baixa, moderada ou altamente resistente adota-se  $RR_{95} < 5$ , entre 5,0 e 10,0 e  $> 10,0$ , respectivamente (Mazzari & Georghiou 1995). Para flebotomíneos ainda não

há esses pontos de corte, o que mais uma vez demonstra a importância da adoção de uma LRS.

Alexander et al. (2009) utilizaram a população de *Lu. longipalpis* da gruta da Lapinha, Lagoa Santa, Minas Gerais, como população controle, quando a comparou em bioensaios de resistência a inseticidas com flebotomíneos capturados em Montes Claros, também em Minas Gerais. Já Pessoa et al. (2015) indicaram os flebotomíneos da Gruta da Lapinha como LRS. Esta população, embora seja silvestre, se mostrou suscetível aos bioensaios de campo realizados pelos autores e atende os critérios da OPAS. No entanto, a população de *Lu. longipalpis* da Gruta Lapinha, é parasitada por nematoides da Ordem Rhabditida e possivelmente da Família Steinernematidae. De acordo com um estudo, esses flebotomíneos na natureza apresentam taxa de infecção, pelos nematoides, extremamente baixas (0,5%), mas em laboratório a taxa de infecção desses parasitas chegam a 50%, comprometendo a manutenção da colônia (Secundino et al. 2002). Por esses achados, não avaliamos esta população como candidata a LRS.

Por outro lado, populações de flebotomíneos coletadas no campo tem apresentado maior suscetibilidade quando comparadas as populações criadas em laboratório, dificultando a interpretação dos resultados. Por exemplo, *Lu. longipalpis* criadas em laboratório apresentaram TL<sub>50</sub> de 13,2 minutos, enquanto que nas populações de campo foi de 8,3 minutos para DDT. Para malation foi de 10,1 minutos para cepa de laboratório, contra 7,2 minutos de campo e para o propoxur foi de 11,4 minutos e 6,3 minutos para população de referência e campo, respectivamente (Mazzari et al. 1997). Esse fenômeno também pode ser observado para *Ph. argentipes* (Dinesh et al. 2010).

Provavelmente, tal fato pode ser explicado pela maior tolerância a inseticidas (Schmidt & Schmidt 1969) das populações de laboratório, cuja alimentação é oferecida com maior frequência e as condições de abrigo e proteção seriam melhores, quando comparadas as condições de campo. Outro fator, que poderia explicar a maior mortalidade em populações de

campo seria que durante a captura e o transporte as amostras poderiam sofrer danos físicos que aumentariam a sua mortalidade.

*Lu. longipalpis*, criados desde 2007, em condições de laboratório também foram mais resistentes do que populações de campo oriundos do município de Araçatuba/SP quando foram expostos aos kits da OMS com papeis impregnados com lambda-cihalotrina (0,05%) e deltametrina (0,5%). Os autores sugerem a não utilização de populações de laboratório nos testes de suscetibilidade, ou seja, os flebotomíneos coletados em campo poderiam ser usados como controle e comparadas com populações expostas capturadas também na natureza (González et al. 2019).

Os procedimentos adotados para estudos de suscetibilidade de mosquitos do gênero *Anopheles* (WHO 2013) e da espécie *Aedes aegypti* (WHO 2016), assim como para insetos da subfamília Triatominae (Obara et al. 2011) não são os mais adequados, em termos de utilização de LRS. Novos critérios e indicadores necessitam ser produzidos para melhorar a detecção de populações resistentes de flebotomíneos.

Dentre os indicadores destacam-se a DD e a DL. Estes indicadores podem ser utilizados de forma qualitativa, ou seja, identificando indivíduos de uma população que conseguem sobreviver a doses que seriam letais para maioria da população, portanto, altas taxas de sobrevivência sugerem resistência dos flebotomíneos. Para triatomíneos, a OMS (OMS 1994) sugere como DD a DL<sub>99</sub> da LRS. Para larvas de mosquitos a recomendação é que a DD seja dobrada, ou seja, duas vezes a DL<sub>99</sub> da LRS, conforme OMS, 2016.

Para flebotomíneos as informações são escassas e confusas, pois não há uma padronização da DD. Por exemplo, experimentos com *Lu. longipalpis* expostos em garrafas do CDC por 35 min. apresentaram diferentes DD para um mesmo produto (deltametrina) – 10 µg/mL e 45 µg/mL (Marcelo et al. 2014, Denlinger et al. 2016). Portanto, é de fundamental importância a adoção de DD para flebotomíneos em ensaios de laboratório para detectar alterações de suscetibilidade neste grupo de insetos.

Poucos estudos avaliaram resistência de flebotomíneos separando fêmeas e machos. Como somente as fêmeas são responsáveis pela

transmissão de protozoários do gênero *Leishmania*, parte dos poucos estudos de suscetibilidade com esse grupo de insetos não utilizam machos. Neste estudo, as comparações dentre os sexos dos flebotomíneos, de acordo com as curvas de sobrevivência de KM, para garrafas (Figuras 14) e cones (Figuras 17), não demonstraram diferenças significativas, ou seja, indicando que machos e fêmeas poderiam ser utilizados juntos nos bioensaios.

Alexander et al. (2009), demonstraram que machos de *Lu. longipalpis* seriam mais suscetíveis do que fêmeas para os inseticidas malation, permetrina e fenitrothion, enquanto que as fêmeas foram mais suscetíveis para deltametrina e lambda-cialotrina. Cabe ressaltar que essas diferenças poderiam influenciar na escolha do inseticida utilizado nos programas de controle das leishmanioses, particularmente no caso de *Lu. longipalpis* s.l., na qual sabe-se que o macho atrai a fêmea para a cópula indicando por meio de sinais químicos (feromônios, batimento de asas) o local para hematofagia (Soares & Turco 2003).

Para flebotomíneos do velho mundo, Saeidi et al. 2012 e 2013, apontaram que os machos de *Ph. papatasi* seriam mais suscetíveis a DDT, permetrina, deltametrina, ciflutrina e lambda-cialotrina, quando comparados às fêmeas. Bidabadi et al. 2017, relataram maior suscetibilidade dos machos de *Ph. papatasi* para o inseticida DDT ( $p = 0,001$ ), no entanto, não viram diferença significativa para os inseticidas permetrina, deltametrina, ciflutrina e lambda-cialotrina. Já os machos da espécie *Ph. argentipes* foram mais suscetíveis do que as fêmeas para DDT (Rama et al. 2017).

Outro parâmetro importante é a padronização da idade dos flebotomíneos para os bioensaios de suscetibilidade a inseticidas. Avaliando esse parâmetro com a metodologia de cones (Figura 21), observou-se diferença significativa, no qual os flebotomíneos com cinco dias de idade morreram mais rápido do que os insetos com três dias. Na metodologia de garrafa, não houve diferença (Figura 18).

A impossibilidade de selecionar flebotomíneos de campo, de acordo com a idade, agregará sempre um viés de seleção aos bioensaios. Uma solução para tal adversidade, seria a criação de flebotomíneos de campo em

insetários para obtenção da geração F1 ou maior, que por sua vez seriam utilizados nos experimentos, assim como fizeram Maroli et al. 2002 e Rama et al. 2015. No entanto, a criação de flebotomíneos é uma tarefa muito difícil e necessita de laboratório com infraestrutura adequada, boas condições de biossegurança e especialistas dedicados, quase que exclusivamente a manutenção das colônias.

Neste estudo, os flebotomíneos foram avaliados quanto à suscetibilidade em relação à dieta. As fêmeas de *Lu. longipalpis* que se alimentaram com sangue, segundo as curvas de sobrevivência de KM (Figura 16) foram mais suscetíveis do que as fêmeas que se alimentaram com açúcar, na metodologia de garrafas. Na comparação entre as dietas com o método de cones, não houve diferença (Figura 19).

Esse resultado provavelmente ocorreu devido à maior distensão abdominal das fêmeas quando alimentaram com sangue. Embora os alimentos açucarados possam preencher uma parte considerável do volume total do abdômen dos flebotomíneos, diferentemente da alimentação no sangue, ele não pode distendê-lo completamente. Essa dilatação, que ocorre quando há um repasto sanguíneo, que garante às fêmeas os nutrientes necessários para a maturação dos ovos (Schlein & Warburg 1985). A distensão expõe as membranas intersegmentares abdominais, facilitando a penetração do inseticida no corpo (Fontán & Zeerba 1987). Portanto, esse resultado sugere que as fêmeas que alimentaram sangue não devem ser usadas em ensaios que testem a suscetibilidade a inseticidas, pois podem superestimar o efeito real do inseticida. Assim, a captura dessas fêmeas alimentadas com sangue deve ser evitada, o que em geral é uma estratégia fácil de ser adotada. No entanto, Bidabadi et al. 2017 e Dinesh et al. 2008, não encontraram diferenças significativas na suscetibilidade das fêmeas de flebotomíneos não alimentadas, alimentadas, grávidas e meio-grávidas.

Como observado na tabela 1, três métodos podem ser usados para avaliação da suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas: o kit de tubos e papéis impregnados da OMS (OMS 2013), os cones da OMS (Pessoa et al. 2015) e as garrafas do CDC (Brogdon & McAllister 1998). Nota-se que 34

experimentos foram conduzidos usando kit de tubos e papéis impregnados da OMS, cinco utilizaram as garrafas do CDC e dois os bioensaios de laboratório com cones da OMS, conforme mostra a Tabela 1.

O kit de tubos e papéis impregnados da OMS é uma ferramenta composta por dois tubos unidos por uma base. De um lado os insetos ficam em repouso sem contato com inseticida e do outro são expostos aos papéis impregnados. Na base há uma porta que permite a passagem dos insetos de um lado para o outro. Esta ferramenta vem sendo utilizada desde a década de 50, sendo o método de avaliação de suscetibilidade mais antigo. Limitações como alto custo, escape dos flebotomíneos pelo portão de exposição dos tubos e telas laterais, áreas do tubo sem presença de inseticida e difícil observação do comportamento dos insetos durante os bioensaio de laboratório dificultam a análise e monitoramento de populações de flebotomíneos (Schmidt & Schmidt 1969, OMS 2013).

O bioensaio com garrafas do CDC funciona com a impregnação de garrafas com inseticidas diluídas em solvente. Os insetos são introduzidos nas garrafas e após o fechamento das tampas, há o início do bioensaio. Embora apresente algumas vantagens sobre o kit de tubos da OMS como, baixo custo, facilidade no transporte, ensaios com diferentes dosagens de inseticidas e área de exposição totalmente revestida por inseticida (Santamaria et al. 2003), destacam-se como desvantagens a dificuldade de introdução e retirada dos insetos no interior da garrafa (Brogdon & Chan 2010, WHO 2013), assim como superfície com pouca aderência, como no caso do vidro, que dificulta o repouso de flebotomíneos nas paredes do frasco.

Experimentos que visam avaliar efeito knockdown em populações expostas a organoclorados e piretróides, certamente terão dificuldades de transferir os espécimes vivos para potes livres de inseticidas. Também, o solvente utilizado pode influenciar na mortalidade de espécies delicadas e de tamanho menor, ou seja, *Lu. longipalpis* quando comparada com a maioria das espécies do gênero *Lutzomyia* é uma espécie robusta, portanto, sua recuperação é mais rápida diante dos efeitos toxicológicos do solvente utilizado (Santamaria et al. 2003). Além disso, Henriquez et al. (2009)



relataram repelência dos flebotomíneos em garrafas impregnadas com lambda-cialotrina e deltametrina diluídos com acetona. Porém, as garrafas impregnadas com os mesmos inseticidas misturados em álcool não interferiram no comportamento dos insetos.

Bioensaio de cone pode avaliar a residualidade de inseticidas em paredes, como também pode ser utilizado como método de avaliação de suscetibilidade de flebotomíneos em laboratório. Neste bioensaio, os insetos são expostos a superfícies tratadas com inseticida e preso por um cone de plástico transparente. Diferente dos outros métodos, este simula a real exposição dos flebotomíneos com ambientes impregnados com inseticida. A desvantagem é que possuem área livre de inseticidas, como por exemplo, no orifício de abertura, onde os flebotomíneos podem permanecer em repouso, sem contato com inseticida (OMS 1998).

Em relação aos dois critérios de mortalidade adotados na literatura de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticida, observou-se diferença significativa entre eles, no qual de acordo com o critério A, os flebotomíneos alcançariam TLs entre 22 e 35 minutos. Já com a adoção do critério B, esses mesmos insetos levariam de 114 a 229 minutos para morrerem (Tabela 3). A maioria dos estudos que avaliaram a suscetibilidade das populações de flebotomíneos ao inseticida não mencionou os critérios de mortalidade aplicados. Nossos resultados recomendam que apenas o critério A seja adotado em estudos futuros de suscetibilidade a flebotomíneos. A adoção do critério B exigiria muito tempo para avaliar a resistência do inseto ao inseticida e poderia mascarar os dados de mortalidade de insetos durante o bioensaio.

Durante os experimentos, foi observado frequentemente a perda de pernas dos flebotomíneos. Esse fenômeno foi avaliado por Santamaria et al. (2016) durante a exposição dos flebotomíneos a piretróides. Os pesquisadores levantaram a hipótese que este fato poderia se dar por um evento denominado “autotomia”, onde animais liberam partes do corpo como mecanismo de defesa, neste caso, devido a intoxicação por inseticidas. Esses autores chegaram à conclusão que a perda das pernas nos flebotomíneos se deu realmente pela exposição aos piretróides.

Nesse trabalho, todos os flebotomíneos que foram tratados com alfacipermetrina no bioensaio de garrafa perderam uma ou mais pernas (Figura 25) corroborando com os resultados de Santamaria et al. (2016). Provavelmente, tal fato pode ser explicado devido à grande excitação e tremores que são produzidos pelos inseticidas da classe dos piretróides (Soderlund 2010).

Nos bioensaios de cone com o inseticida bendiocarb também foi observado perda de pernas em flebotomíneos (Figura 25). Esse é o primeiro registro deste fenômeno a esta classe de inseticida. No entanto, o ocorrido pode não ter relação com o inseticida, e sim com a metodologia. Santamaria et al. (2016) observaram a perda de pernas dos insetos também no grupo controle, o que pode ter sido causado pelo manuseio dos flebotomos, assim como no caso dos flebotomíneos expostos ao bendiocarb. Novos experimentos avaliando estes efeitos devem ser realizados, a fim de esclarecer o que de fato causa a perda das pernas de flebotomíneos.

A análise da perda de pernas na alimentação dos flebotomíneos (Tabela 6) confirmou a suspeita levantada por Alexander et al. (2009) que sugeriu que flebotomíneos com ausência de uma ou mais pernas não conseguiriam se alimentar. Embora Denlinger et al. (2015) e Santamaria et al. (2016) tenham conseguido demonstrar a alimentação de flebotomíneos em condições de laboratório, talvez isto não se repita em condições de campo. Uma fotografia de *Lu. longiflocosa*, com apenas três pernas, se alimentando em um homem foi registrada por Santamaria et al. (2016). Segundo os autores, tal fato poderia comprovar a capacidade de alimentação de flebotomíneos moribundos em condições naturais. Porém, outros hospedeiros reagiriam a tentativa de ataque deste inseto e dificultaria este repasto sanguíneo. Deste modo, sugerimos que novos trabalhos sejam realizados para determinar a influência deste efeito na alimentação de flebotomíneos.

A metodologia de cone para avaliação da suscetibilidade de flebotomíneos, comumente utilizada em paredes impregnadas com inseticida, foi aqui adaptada para testes em laboratório. Os resultados dos ensaios demonstram que este método se equipara ao de garrafas e kit de papéis

impregnados e pode também ser utilizado para avaliação de resistência de insetos em laboratório. Nos bioensaios de garrafas do CDC, a acetona é o diluente mais utilizado, porém sabe-se quando expostos durante muito tempo produz efeito anestésico sobre insetos, os quais podem levar a morte. Henriquez et al. (2009) verificaram a repelência de *Pi. evansi* em garrafas impregnadas com lambda-cialotrina e deltametrina diluídos com acetona. Porém, as garrafas impregnadas com os mesmos inseticidas misturados em álcool não interferiram no comportamento dos insetos.

Certamente, o número de populações de flebotomíneos resistentes poderia ser diferente, caso houvesse uma padronização de metodologias e parâmetros para os bioensaios de laboratório existentes. Ainda, seria possível a detecção de resistência nas populações de maneira precoce, facilitando a tomada de decisão dos programas de controle das leishmanioses, em relação ao manejo de inseticidas. Nota-se a necessidade de futuras pesquisas que incorporem novas metodologias de exposição, pontos de corte para classificação de resistência e critérios de mortalidade para aprimorar a detecção de resistência em flebotomíneos.

A princípio, a metodologia de garrafa do CDC tem se mostrado mais apropriada para estudos de suscetibilidade de flebotomíneos. No entanto, sugerimos a utilização de LRS específica para cada espécie com o intuito de estimar DD e/ou TD. Esses parâmetros devem ser utilizados para detectar populações com alterações de suscetibilidade, cujos valores de RR permitirão quantificar os níveis de resistência, em comparação com a LRS.

## 7. CONCLUSÕES

- ✓ Até dezembro de 2019 foram detectadas 47 populações de Phlebotominae com resistência confirmada para um ou mais inseticidas e outras 28 populações consideradas tolerantes. As populações resistentes compreenderam as espécies *Ph. papatasi*, *Ph. argentipes*, *Se. shorttii* e um pool de cinco espécies de flebotomíneos, enquanto as populações tolerantes compreenderam *Ph. papatasi*, *Ph. argentipes*, *Ph. sergenti*, *Lu. longipalpis* e um pool de cinco espécies de flebotomíneos. Com exceção de um registro de resistência no Egito e um na Turquia, todos os demais registros de resistência de flebotomíneos ocorreram na Índia;
- ✓ Idade e estado nutricional dos flebotomíneos podem influenciar a avaliação do perfil de suscetibilidade a inseticidas, uma vez que flebotomíneos com cinco dias de idade foram mais suscetíveis do que os flebotomíneos com três dias, e as fêmeas alimentadas com sangue foram mais suscetíveis, quando comparadas às fêmeas alimentadas apenas com solução açucarada. Porém, o sexo dos insetos não demonstra impactar nas análises. Essas informações são importantes para o desenvolvimento de protocolos específicos para o monitoramento de resistência de flebotomíneos a inseticidas;
- ✓ A população de *Lu. longipalpis* oriunda de Jacobina e criada na Fiocruz do Rio de Janeiro deve ser adotada como a LRS no Brasil, em virtude de esta atender aos requisitos da OPAS e se mostrar extremamente suscetível nos bioensaios. A partir da LRS será possível aprimorar os experimentos de suscetibilidade de flebotomíneos, no Brasil;

- ✓ Não houve diferença entre os diluentes álcool e acetona para o bioensaio de garrafas do CDC, sugerindo a utilização de ambos os diluentes nos ensaios laboratoriais;
- ✓ O critério de mortalidade mais adequado numa avaliação de suscetibilidade a inseticida é aquele que caracteriza como mortos os flebotomíneos que apresentaram incapacidade de voar e/ou voos descoordenados;
- ✓ A perda de pernas pelos flebotomíneos ocorreu devido a exposição ao inseticida piretróide alfacipermetrina. A metodologia de garrafa também influencia neste fenômeno.

## 8. REFERÊNCIAS

Aboul Ela RG, Morsy TA, el-Gozamy BM, Ragheb DA. The susceptibility of the Egyptian *Phlebotomus papatasi* to five insecticides. J. Egypt Soc. Parasitol. 1993;23(1):69-94.

Afshar AA, Rassi Y, Sharifi I, Abai M, Oshaghi M, Yaghoobi-Ershadi M. et al. Susceptibility Status of *Phlebotomus papatasi* and *P. sergenti* (Diptera: Psychodidae) to DDT and Deltamethrin in a Focus of Cutaneous Leishmaniasis after Earthquake Strike in Bam, Iran. Iran. J. Arthropod. Borne. Dis. 2011;5(2):32-41.

Aguiar GM, Medeiros WM. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In Rangel EF, Lainson R (org.), Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ. 2003;368pp.

Alexander B, Barros VC, De Souza SF, Teodoro LP, Soares ZR, Gontijo NF, et al. Susceptibility to chemical insecticides of two Brazilian populations of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Trop. Med. Int. Health 2009;14:1272-1277.

Alexander B, Maroli M. Control of phlebotomine sandflies. Med. Vet. Entomol. 2003;17(1):1-18.

Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavete C, Dedet JP, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. Clin. Microbiol. Ver. 2008;21:334359.

Álvarez L, Duran YD, González A, Suárez J, Oviedo M. Concentraciones letales y dosis diagnosticas de lambda-cyhalotrina y fenitrotion sobre *Lutzomyia evansi* (Díptera: Psychodidae) de los Pajones, estado Trujillo, Venezuela. Bol. Malariol. Salud Ambiental. 2006;46(1).

Amalraj DD, Sivagnaname N, Srinivasan R. Susceptibility of *Phlebotomus argentipes* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae) to insecticides. J. Commun. Dis. 1999;31(3):177-80.

Arzamani K, Vatandoost H, Rassi Y, Abai MR, Akhavan AA, Alavinia M, et al. Susceptibility status of wild population of *Phlebotomus sergenti* (Diptera: Psychodidae) to different imagicides in a endemic focus of cutaneous leishmaniasis in northeast of Iran. J. Vector. Borne. Dis. 2017;54(3):282-6.

Artemiev MM, Gadzhibekova EA, Bondareva NI. Susceptibility of sandflies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) to DDT in the focus of visceral leishmaniasis in the Azerbaijan SSR. Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni. 1984;6:72-74.

Bansal SK, Singh KV. 1996. Susceptibility status of *Phlebotomus papatasi* and *Sergentomyia punjabaensis* (Diptera:Psychodidae) to some insecticides in district Bikaner (Rajasthan). J. Commun. Dis. 1996;28(1):28-32.

Barata RA, Michalsky EM, Fujiwara RT, França-Silva JC, Rocha MF, Dias ES. Assessment of sandfly (Diptera, Psychodidae) control using cypermethrin in an endemic area for visceral leishmaniasis, Montes Claros, Minas Gerais state, Brazil. Cad. Saude Publica. 2011;27:2117-2123.

Basak B, Tandon N. Observations on susceptibility status of *Phlebotomus argentipes* to DDT in district South 24-Parganas, West Bengal. J. Commun. Dis. 1995;27(3):196-7.

Bidabadi SL, Zahraei-Ramazani A, Yaghoobi-Ershadi MR, Rassi Y, Akhavan AA, Oshaghi MA, et al. Assessing the insecticide susceptibility status of field population of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in a hyperendemic area of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Esfahan Province, Central Iran. Acta Trop. 2017;176:316-322.

Brasil. Estado de São Paulo. Cartilha. Manejo Ambiental para Controle de Leishmaniose Visceral Americana (LVA). 2012;26pp.

Brasil. Ministério da Saúde. Leishmaniose Tegumentar (LT): o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. 2020; disponível em: <<https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar>>. Acesso em: 01 de Abr. 2020a.

Brasil. Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. 2020; disponível em: <<https://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 01 de Abr. 2020b.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1ª. Edição. Brasília-DF: editora do Ministério da Saúde. 2014;120p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual da Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 3ª. Edição. Brasília-DF: editora do Ministério da Saúde. 2017;180p.

Bray DP, Hamilton JGC. Insecticide-impregnated netting as a potential tool for long-lasting control of the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* in animal shelters. *Parasit. Vectors*. 2013;6:133.

Brogdon WG, McAllister JC. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1998;14(2):159-164.

Bustamante-Teixeira MT, Faerstein E, Latorre MR. Survival analysis techniques. *Cad. Saúde Pública*. 2002;18:579-594.

Carvalho IPSF, Peixoto HM, Romero GAS, Oliveira MRF. Cost of visceral leishmaniasis care in Brazil. *Trop. Med. Int. Health*. 2017;22(12):1579-1589.

Cavalier-Smith, T. Higher classification and phylogeny of Euglenozoa. *Eur. J. Protistol.* 2016;56: 250-276.



Chandra G, Bhattacharya J, Hati AK. Susceptibility status of *Phlebotomus argentipes* to DDT, dieldrin and malathion in Hoogly, West Bengal. J. Commun. Dis. 1995;27(4):247-9.

Chowdhury R, Das ML, Chowdhury V, Roy L, Faria S, Priyanka J, et al. Susceptibility of field-collected *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae) sand flies from Bangladesh and Nepal to different insecticides. Parasit. Vectors. 2018;411(1):336.

Courtenay O, Gillingwater K, Gomes PA, Garcez LM, Davies CR. Deltamethrin-impregnated bednets reduce human landingrates of sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* in Amazon households. Med. Vet. Entomol. 2007;21:168-176.

Dantas-Torres F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. Trends Parasitol. 2011;27:155–159.

Das Gupta RK, Saxena NB, Joshi RD, Rao JS. DDT resistance in *P. papatasi* in Bihar. J. Commun. Dis. 1995;27(2):124.

De Silans LN, Dedet JP, Arias JR. Field monitoring of cypermethrin residual effect on the mortality rates of the Phlebotominae sand fly *Lutzomyia longipalpis* in the state of Paraiba, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1998;93:339–344.

Denlinger DS, Lozano-Fuentes S, Lawyer PG, Black WC 4th, Bernhardt SA. Assessing Insecticide Susceptibility of Laboratory *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* Sand Flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). J. Med. Entomol. 2015;52(5):1003-1012.

Denlinger DS, Creswell JA, Anderson JL, Reese CK, Bernhardt SA. Diagnostic doses and times for *Phlebotomus papatasi* and *Lutzomyia longipalpis* sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) using the CDC bottle bioassay to assess insecticide resistance. Parasit. Vectors. 2016;9:212.

Dey A, Singh S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of the literature. *Indian J. Med. Microbiol.* 2006;24:165-170.

Dhanda V, Shetty PS, Dhiman RC. Studies on phlebotominae sandflies as vectors of kala-azar in Bihar. *Proceedings of the Indo-UK Workshop on Leishmaniasis.* *Indian Co. Med. Res.* 1983;28:137.

Dhiman RC, Mittal PK. A note on susceptibility status of *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) population to insecticides. *J Commun Dis.* 2000;32:65–6.

Dhiman RC, Raghavendra K, Kumar V, Kesari S, Kishore K. Susceptibility status of *Phlebotomus argentipes* to insecticide in districts Vaishali and Patna. *J. Commun. Dis.* 2003;35:49–51.

Dinesh DS, Das P, Picado A, Davies C, Speybroeck N, Ostyn B, et al. Long-lasting insecticidal nets fail at household level to reduce abundance of sandfly vector *Phlebotomus argentipes* in treated houses in Bihar (India). *Trop Med Int Health.* 2008;13(7):953-8.

Dinesh DS, Das ML, Picado A, Roy L, Rijal S, Singh SP, et al. Insecticide susceptibility of *Phlebotomus argentipes* in visceral leishmaniasis endemic districts in India and Nepal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010;4(10):e859.

Dougall AM, Alexander B, Holt DC, Harris T, Sultan AH, Bates PA, et al. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *Int. J. Parasitol.* 2011; 41:571-579.

Fahnmy RA, Khater EI, Sawaf BE, Shehata M. Insecticide susceptibility status of field populations of sandfly *Phlebotomus papatasi* in the Sinai Peninsula, Egypt. World Health Organization; 1996. Unpublished document. WHO/Leish/96.38

Falcão AR, Pinto CT, Gontijo CMF. Suscetibility of *Lutzomyia longipalpis* to deltametrin. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1988; 83(3): 395-396.

Falcão AR. DDT and dieldrin susceptibility of a natural population of *Phlebotomus longipalpis* in Minas Gerais, Brazil. Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop. 1963;15:411-5.

Faraj C, Ouahabi S, Adlaoui EB, Elkohli M, Lakraa EL, Rhazi M, et al. Insecticide susceptibility status of *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* and *Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi* in endemic foci of cutaneous leishmaniasis in Morocco. Parasit. Vectors. 2012;5:51.

Fawaz EY, Zayed AB, Fahmy NT, Villinski JT, Hoel DF, Diclaro JW. Pyrethroid Insecticide Resistance Mechanisms in the Adult *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). J. Med. Entomol. 2016;53(3):620-8.

Foglia-Manzillo V, Oliva G, Pagano A, Manna L, Maroli M, Gradoni L. Deltamethrin impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: Evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of Leishmania infection in kennelled stray dogs. Vet. Parasitol. 2006;142:142–145.

Fontán A, Zerba EN. Mode of entry insecticides in *Triatoma infestans*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 1987;4:313–323.

Forattini, OP. Entomologia Médica. Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. São Paulo: Ed. Edgard Blücher. 1973;658pp.

Galati EAB. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. Bol. Dir. Malariol. Saneam. Amb. 1995; 35:133-142.

Galati EAB. Classificação de Phlebotominae. In EF Rangel, R Lainson, Flebotomíneos do Brasil, Fiocruz. 2003;23-51.

Galati EAB. Apostila de bioecologia e identificação de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) – Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública

da USP, São Paulo, Brasil. 2019;139pp. Disponível em <<http://www.fsp.usp.br/egalati>>. Acesso em: 05 de Nov 2019.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro Atual, Desafios e Perspectivas. Ver. Bras. Epidemiol. 2004;7(3):338-349.

González MA, Bell MJ, Bernhardt SA, Brazil RP, Dilger E, Courtenay O, et al. Susceptibility of wild-caught *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sand flies to insecticide after an extended period of exposure in western São Paulo, Brazil. Parasit. Vectors. 2019;12(1).

Hadjinicolaou J. Present status of *Phlebotomus* in certain areas of Greece. Bull. World Health Organ. 1958;19(6):967-79.

Hassan MM, Widaa SO, Osman OM, Numiary MSM, Ibrahim MA, Abushama HM. Insecticide resistance in the sand fly, *Phlebotomus papatasi* from Khartoum State, Sudan. Parasit. Vectors. 2012;5:46.

Henriquez C, Pereira Y, Cochero S, Bejarano EE. Dosis diagnóstica y umbral de resistencia de *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae), a dos insecticidas utilizados en salud pública en Colombia: deltametrina y lambdacihalotrina. Rev. Soc. Entomol. Argent. 2009;68(3-4):287-294.

Joshi GC, Kaul SM, Wattal BL. Susceptibility of Sandflies to organochlorine insecticides in Bihar (India) - further reports. J. Commun. Dis. 1979;11(4):209-13.

Karakus M, Gocmen B, Ozbel Y. Insecticide Susceptibility Status of Wild-Caught Sand Fly Populations Collected from Two Leishmaniasis Endemic Areas in Western Turkey. J. Arthropod Borne Dis. 2017;11(1):86-94.

Karakus M, Sarikaya Y, Oguz G, Dogan M, Ergan G, Gunay F, et al. Assessment of diagnostic doses for widely used synthetic pyrethroids (Deltamethrin & Permethrin) in an endemic focus of leishmaniasis in Turkey. Parasit. Vectors. 2016;9(1):526.

Kaul SM, Wattal BL, Bhatnagar VN, Mathur KK. Preliminary observations on the susceptibility status of *Phlebotomus argentipes* and *P. papatasi* to DDT in two districts of North Bihar (India). J Commun Diseases. 1978;10:208-211.

Kaul SM, Sharma RS, Borgohain BK. D.D.T. resistance in *Sergentomyia shorttii* (Diptera: Psychodidae) in Kamrup, Assam--first report in *Sergentomyia* genus. J. Commun. Dis. 1994;26(2):100-2.

Killick-Kendrick R. Biology of *Leishmania* in phlebotomine sand fly. In: WHR. Lumsden WHR and Evans DA, editors. Biology of the kinetoplastida. Volume 2. Academic Press, London, New York & San Francisco. 1979;396-449pp.

Killick-Kendrick R. Education is key to controlling visceral leishmaniasis. Bull World Health Organ. 2010;88:11-12.

Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP, Cadiergues MC. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. Med. Vet. Entomol. 1997;11(2):105-111.

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. Med. Vet. Entomol. 1990;4:1-24.

Kirk R, Lewis DJ. The susceptibility of *Phlebotomus* species to DDT. J. Trop. Med. Hyg. 1949;52(11):223-5.

Kumar VL, Shankar S, Kesari GS, Bhunia DS, Dinesh R. Mandal, et al. Insecticide susceptibility of *Phlebotomus argentipes* & assessment of vector control in two districts of West Bengal, India. Indian J. Med. Res. 2015;142(2):211-5.

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis and leishmaniasis of the New World, with particular reference to Brazil. Bull. Pan. Am. Health Org. 1973;7(4):1-19.

Lavagino A, Ansaldi G. Susceptibility tests on *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus perfilliewi* wild populations in Sicily. *Parassitologia*. 1991;33:349-51.

Li AY, Perez-de-Leon AA, Linthicum KJ, Britch SC, Bast JD, Debboun M. Baseline Susceptibility to Pyrethroid and Organophosphate Insecticides in Two Old World Sand Fly Species (Diptera: Psychodidae). *US. Army Med. Dep. J.* 2015;3-9.

Marceló C, Cabrera OL, Santamaría E. Discriminating concentrations for three insecticides used in public health in a *Lutzomyia longipalpis* experimental strain from Colombia. *Biomedica*. 2014;34(4):624-30.

Marcondes CB, Nascimento JA. Avaliação da eficiência de deltrametrina (K-Othrine CE) no controle de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) no município de Santa Rita, Paraíba, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1993;26: 15-18.

Maroli M, Cianchi T, Bianchi R, Khoury C. Testing insecticide susceptibility of *Phlebotomus perniciosus* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae) in Italy. *Ann Ist Super Sanita*. 2002;38(4):419-423.

Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med. Vet. Entomol.* 2013;27:123–47.

Mazzarri MB, Feliciangeli MD, Maroli M, Hernandez A, Bravo A. Susceptibility of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to selected insecticides in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Venezuela. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1997;13(4):335-41.

Mazzari MB, Georghiou GP. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1995;11:315-322.

Melander AL. Can insects become resistant to sprays? J. Econ. Entomol. 1914; 7:167-172.

Monteiro PS, Lacerda MM, Arias JB. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1994;27(2):67-72.

Mukhopadhyay AK, Saxena NBL, Narasimham MVVL. Susceptibility status of *Phlebotomus argentipes* to DDT in some kala-azar endemic areas of Bihar (India). Ind. J. Med. Res. 1990;91:458-60.

Mukhopadhyay AK, Saxena NBL, Narasimham MVVL. Susceptibility status of *Phlebotomus argentipes* to DDT in some kala-azar-endemic districts of Bihar, India. World Health Organ. Division of Control of Tropical D. 1992.

Nandi J, Chaudhuri I, Das C, Mukhopadhyay AK. Susceptibility status of *Phlebotomus argentipes*, to synthetic pyrethroid insecticides in kala azar endemic parts of Bihar, India in relation to elimination of visceral leishmaniasis. Ind. J. Pub. Health Res. Dev. 2016;7(4):36-8.

Nery-Guimarães F, Bustamante FM. Aplicação domiciliar de DDT como base da profilaxia das leishmanioses – Estudo de um foco de leishmaniose mucocutânea cinco anos depois da aspersão periódica com aquele inseticida. Rev. Bras. Malariol. Doenças. 1954;6:127-130.

Obara MT, Otrera VCG, Gonçalves RG, Santos JP, Santalucia M, Rosa JA, et al. Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae) ao inseticida deltametrina, na região Centro-Oeste do Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2011;44(2):206-212.

Oliveira-Filho AM, Melo MTV. Vectors control importance on leishmaniasis transmission. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1994;89:451-6.

OMS. Organização Mundial de Saúde. 7th report of the World health expert comité on insecticides. (Série de Informes Técnicos, 125). Geneva. 1957.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Control of leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Tech Rep Ser. 2010;949:1-186.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Instruction for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorines, organophosphate and carbamate insecticides diagnostic test. 1981a;81.806.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult blackflies, sandflies and biting midges to insecticides. Mimeographed document, WHOiVBCi. 1981b;81.810.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Leishmaniasis. 2020; Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 05 de Jun. 2020.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Protocolo de evaluación de efecto insecticida sobre triatominos. Acta Toxicol. Argentina. 1994;2:29-32.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual). Geneva. 1998.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. Geneva. 2013.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes, 2nd ed. Switzerland: World Health Organization. 2016.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Vector resistance to pesticide. Expert Committee on vector biology and control (Série de Informes Técnicos, 818). Geneva. 1992.

OPAS. Organização Panamericana de Saúde. II Reunion tecnica latinoamericana de monitoreo de resistencia a insecticidas em triatominos vectores de Chagas. Panamá. 2005;11a13Abr.



Ostyn B, Vanlerberghe V, Picado A, Dinesh DS, Sundar S, et al. Vector control by insecticide-treated nets in the fight against visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent, what is the evidence? *Trop. Med. Int. Health.* 2008;13:1073–85.

Owusu HF, Jancáryová D, Malone D, Müller P. Comparability between insecticide resistance bioassays for mosquito vectors: time to review current methodology? *Parasit. Vectors.* 2015;8:357.

Pener H, Wilamovsky A. Base-line susceptibility of *Phlebotomus papatasi* to insecticides. *Med. Vet. Entomol.* 1987;1(2):147-9.

Pessoa FAC, Medeiros JF, Barrett TV. Effects of timber harvest on phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a production forest: abundance of species on tree trunks and prevalence of trypanosomatids. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2007;102(5):593-599.

Pessoa GC, Lopes JV, Rocha MF, Pinheiro LC, Rosa AC, Michalsky EM, et al. Baseline susceptibility to alpha-cypermethrin in *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) from Lapinha Cave (Brazil). *Parasit. Vectors.* 2015;8:469.

Pugedo H, Barata RA, França-Silva JC, Silva JC, Dias ES. HP: an improved model of suction light trap for the capture of small insects. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2005;38:70-72.

Rahman SJ, Wattal BL, Mathur KK, Joshi GC, Kumar K. Suscetibility of laboratory reared strain of *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) to organochlorine insecticides. *J Commun Diseases.* 1982;14:122-124.

Rama A, Kesari S, Das P, Kumar V. Studying DDT Susceptibility at Discriminating Time Intervals Focusing on Maximum Limit of Exposure Time Survived by DDT Resistant *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae): an Investigative Report. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2017;70(4):437-41.

Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF. Biologia de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae) em condições experimentais: II. Influência de fatores ambientais no comportamento das formas imaturas e adultas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1987;82(3):385-394.

Rashti MA, Panah HY, Mohamadi HS, Jedari M. Susceptibility of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to DDT in some foci of cutaneous leishmaniasis in Iran. J. Am. Mosq. Control Assoc. 1992;8(1):99-100.

Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. Annu Rev Entomol. 2013;58:227-50.

Rocha DA, Almeida MR, Batista JAS, Andrade AJ. LutzDex™ - A digital key for Brazilian sand flies (Diptera, Phlebotominae) within an Android App. Zootaxa. 2019;4688(3):382–388.

Rocha DA, Andrade JA, Moura LR, Figueiredo NG, Pessoa GCD, Obara MT. Susceptibility of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) collected in the field, to alpha-cypermethrin in four municipalities endemic to leishmaniasis. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 2020;62(38).

Romero GAS, Boelaert M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America - A Systematic Review. PLoS Negl. Trop. Dis. 2010;4(1):e584.

Saeidi Z, Vatandoost H, Akhavan AA, Yaghoobi-Ershadi MR, Rassi Y, Arandian MH, et al. Baseline insecticide susceptibility data of *Phlebotomus papatasi* in Iran. J. Vector. Borne Dis. 2013;50(1):57-61.

Saeidi Z, Vatandoost H, Akhavan AA, Yaghoobi-Ershadi MR, Rassi Y, Sheikh Z, et al. Baseline susceptibility of a wild strain of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to DDT and pyrethroids in an endemic focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. Pest. Manag. Sci. 2012;68(5):669-75.

Santamaria E, Munstermann LE, Ferro C. Standardization of the method proposed by the World Health Organization for determining the susceptibility levels of leishmaniasis vectors to insecticides. *Biomedica*. 2002;22(2):211-8.

Santamaría E, Munstermann LE, Ferro C. Approximation to the CDC method to determine insecticide susceptibility in leishmaniasis vectors. *Biomédica*. 2003;23 (1):115-21.

Santamaria E, Cabrera OL, Avendano J, Pardo RH. Leg loss in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) due to pyrethroid exposure: Toxic effect or defense by autotomy? *J. Vector Borne Dis*. 2016;53(4):317-326.

Sardar AA, Saha P, Chatterjee M, Bera DK, Biswas P, Maji D, et al. Insecticide susceptibility status of *Phlebotomus argentipes* and polymorphisms in voltage-gated sodium channel (vgsc) gene in Kala-azar endemic areas of West Bengal, India. *Acta Trop*. 2018;185:285-93.

SAS Institute INC. JMP Statistical Software. Cary, North Caroline, USA. 2018.

Schlein Y, Warburg A. Feeding behavior, midgut distension and ovarian development in *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Insect Physiology*. 1985;31(1):47-51.

Secundino NFC, Araújo MSS, Oliveira GHB, Massara CL, Carvalho OS, Lanfredi RM, Pimenta PFP. Preliminary description of a new entomoparasitic nematode infecting *Lutzomyia longipalpis* sand fly, the vector of visceral leishmaniasis in the New World. 2002;80(1):35-40.

Sherlock IA. A importância dos flebotomíneos. In: Rangel EF, Lainson R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz. 2003;15-21.

Schmidt ML, Schmidt JR. Insecticide susceptibilities of *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) from Egypt and the Sudan. *J. Med. Entomol*. 1969;6(1):87-90.

Shimabukuro PHF, Andrade AJ, Galati EAB. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. ZooKeys (Online). 2017;660:67-106.

Silva RA, Andrade AJ, Quint BB, Raffoul GES, Werneck GL, Rangel EF, Romero GAS. Effectiveness of dog collars impregnated with 4% deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2018;113(5)e170377.

Singh KV, Bansal SK. Insecticide susceptibility of *Phlebotomus papatasi* to organochlorine, organophosphate & carbamate compounds in some arid areas of western Rajasthan. Ind. J. Med. Res. 1996;103:91-3.

Singh R, Das RK, Sharma SK. Resistance of sandflies to DDT in Kala-azar endemic districts of Bihar, India. Bull. World Health Organ. 2001;79(8):793.

Singh RK, Mittal PK, Dhiman RC. Insecticide susceptibility status of *Phlebotomus argentipes*, a vector of visceral leishmaniasis in different foci in three states of India. J. Vector Borne Dis. 2012;49(4):254-7.

Singh R, Kumar P. Susceptibility of the sandfly *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti (Diptera: Psychodidae) to insecticides in endemic areas of visceral leishmaniasis in Bihar, India. Jpn. J. Infect. Dis. 2015;68(1):33-37.

Soares RPP, Turco SJ. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. An. Acad. Bras. Ciênc. 2003;75(3):301-330.

Soderlund DM. State-dependent modification of voltage-gated sodium channels by pyrethroids. Pestic Biochem. Physiol. 2010;97:78–86.

Sudia WD, Chamberlain RW. Battery operated light trap, an improved model, Mosquito News. 1962;25:172-182.

Tetreault GE, Zayed AEBB, Hanafi HA, Beavers GM, Zeichner BC. Susceptibility of sand flies to selected insecticides in North Africa and the Middle East. *J. American Mosq. Contr. Assoc.* 2001;17(1):23-7.

Turchetti AP, Souza TD, Paixão TA, Santos RL. Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2014;8:403-407.

Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem. Am. Entomol. Inst.* 1994;54:881pp.

Zhogolev DT, Kachanova AP. On sensitivity of sandflies to chlorophose. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni.* 1968;37(1):53-55.

## 9. ANEXO I

Artigo I – Submetido à revista Acta tropica.

23/08/2020

Gmail - Your manuscript ACTROP\_2020\_1004 has been sent for review



Douglas de Almeida Rocha <dougalmeidarocha@gmail.com>

---

### Your manuscript ACTROP\_2020\_1004 has been sent for review

1 mensagem

---

**Acta Tropica** <Evisesupport@elsevier.com>

26 de junho de 2020 18:06

Responder a: actrop@elsevier.com

Para: dougalmeidarocha@gmail.com

*This message was sent automatically.*

Reference: ACTROP\_2020\_1004

Title: Methods for detecting insecticide resistance in sandflies: a systematic review

Journal: Acta Tropica

Dear Ms. Rocha,

I am currently identifying and contacting reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer review is a voluntary service it can take time to find reviewers who are both qualified and available. While reviewers are being contacted, the status of your manuscript will appear in EVISE® as 'Reviewer Invited'.

Once a reviewer agrees to review your manuscript, the status will change to 'Under Review'. When I have received the required number of expert reviews, the status will change to 'Ready for Decision' while I evaluate the reviews before making a decision on your manuscript.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® and go to 'My Submissions' via:  
[http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL\\_ACR=ACTROP](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=ACTROP)

Kind regards,

Acta Tropica

**Have questions or need assistance?**

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

## **Methods for detecting insecticide resistance in sand flies: a systematic review**

Douglas de Almeida Rocha<sup>a\*</sup>, Lidiane Medeiros da Costa<sup>b</sup>, Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa<sup>b</sup> and Marcos Takashi Obara<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Laboratory of Medical Parasitology and Vector Biology, University of Brasília, Darcy Ribeiro University Campus, Asa Norte, 70910-900, Federal District, Brasília.

<sup>b</sup> Hematophagous Insect Physiology Laboratory, Federal University of Minas Gerais, Pampulha Campus, 31970-201, Belo Horizonte, Minas Gerais.

\* Corresponding author at: Laboratory of Medical Parasitology and Vector Biology, University of Brasília, Darcy Ribeiro University Campus, Asa Norte, 70910-900, Federal District, Brasília. Tel.: +55 61 985900569; fax: +55 61 33710081.

E-mail addresses

Douglas de Almeida Rocha - dougalmeidarocha@gmail.com

Lidiane Medeiros da Costa - lidianem.dacosta@gmail.com

Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa – grasiellepessoa2016@gmail.com

Marcos Takashi Obara – marcos.obara@gmail.com

## **Abstract**

The classification of insecticide resistance in sand flies populations is based on concepts and methodologies used to characterize the susceptibility profile in mosquitoes. This can generate erroneous and subjective interpretations since they are biologically different organisms. In this context, the goal of this review is to analyze the works and/or articles that aimed at characterizing the susceptibility of sand flies and describing the methodological parameters, in order to improve future works to estimate more accurately the resistance of sand flies to insecticides. Using keywords that refer to the purpose of this review, scientific studies in English, Spanish and Portuguese published until December 2019 were analyzed. A total of 3481 articles were found in searches in four databases (Pubmed, Scopus, BVS and ScienceDirect) and 61 were selected. Records of sand-fly resistance are described for all classes of insecticides, mainly for *Phlebotomus papatasi* and *Ph. argentipes*. World Health Organization (WHO) kits with impregnated papers are the most widely used method to assess the susceptibility of sand flies to insecticides. However, only two studies presented comparisons between field sand flies with Susceptibility Reference Lineage (SRL), and the lethal doses and lethal times of sand flies are very varied, revealing that there is no specific protocol for assessing the susceptibility of sand flies to insecticides. For a quick and early detection of sand flies' resistance to insecticides, we suggest the definition of SRL, as well as new research to analyze the interference of generation, nutritional status, age and sex in sand-fly susceptibility experiments, in order to ensure an effective resistance monitoring.



## **Introduction**

Leishmaniasis represent a set of infectious diseases that can manifest in humans when they have contact with the transmission cycle of the more than 20 species of *Leishmania* protozoa that cause the diseases (Lainson and Shaw, 1979). The main form of transmission to humans occurs through the bite of female sand flies infected by these parasites. The main clinical forms are visceral leishmaniasis (VL), post-kala-azar dermal leishmaniasis (DL), cutaneous leishmaniasis (CL) and mucocutaneous leishmaniasis (ML). VL, when left untreated, leads to death in 90% of cases (Killick-Kendrick, 2010). Conversely, CL is the most common and spontaneously healing form of the disease and affects around one million people annually worldwide (Bailey, et al. 2019).

Due to the lack of a safe and efficient vaccine to fight leishmaniasis (Ghorbani and Farhoudi, 2018), as well as the low adherence to treatment because of the scheme of prolonged use of antimonials (Romero and Boelaert, 2010) and the several side effects caused by anti-*Leishmania* drugs (Burza et al., 2018), eliminating the vector is the best way to interrupt human transmission in endemic areas (Alexander et al., 2003). To reduce the incidence of the human disease, chemical control is used through the application of insecticides. These applications have been done since the 1940s, often without the desired residual effect (Romero and Boelaert, 2010). In addition, areas where endemics overlap with the indiscriminate use of insecticides to control vector insects provided the selection of populations of resistant sand flies (Dhiman and Yadav, 2016).

The classification of sand-fly populations into resistant or susceptible to insecticides is based on concepts and methodologies recommended for the detection

of resistance in mosquitoes (WHO, 1981a; Brogdon and McAllister, 1998). These methodologies are constantly updated (WHO, 2016a; WHO 2016b) and have often been gradually adapted to estimate resistance in sand flies, without any specific standardization for the group, however.

Saeidi et al. (2012) mentioned that laboratory bioassays for detecting resistance in sand flies must follow their own protocol, aiming to delimit specific cutoff points for the classification of susceptibility, tolerance and resistance. In addition, several problems have been detected in relation to the existing methodologies. Among them we can mention the use of inadequate tools (Schimidt and Schmid, 1969; Santamaria et al., 2002), different diagnosis doses for the same species (Henriquez et al., 2009; Marceló et al., 2014; Denlinger et al., 2016) and the lack of a Susceptibility Reference Lineage (SRL) for susceptibility testing with sand flies (Mazzarri et al., 1997, González et al., 2019).

In this context, the objective of this review was to assess the existing literature that aimed to characterize the susceptibility/resistance of sand flies. In particular, the review focused on the analysis of the methodologies and description of the existing parameters to standardize future research that allows a more precise detection of alterations in sand flies' susceptibility to insecticides.

## **Material and methods**

The Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analysis (PRISMA) statement was used to guide the process and reporting of this review (Supplement 1 - checklist). The resources and strategies for searching and selecting studies were defined and selected based on four fundamental items: *i) Search sources*

– four indexed electronic databases, Pubmed, Scopus, BVS and ScienceDirect, and search for citations in the articles found; *ii) Language* – English, Spanish and Portuguese; *iii) Keywords* – the terms MeSH (Medical Subject Headings) were selected according to the PICO strategy, considering the population, the intervention used and the outcomes which were adopted (Supplement 2 – search strategy); and *iv) Date of publication* – articles published between 1940 and December 2019. The strategy adopted for the different databases was validated by a group specialized in systematic revision and is described in an additional file. The literature search was carried out on December 27, 2019.

The works retrieved from the databases were initially stored in the *EndNote X7 software* for organizing bibliographic references. After that, the studies that were duplicated between the databases were identified. Then, the abstracts of the stored scientific articles were read. When this reading was not sufficient to establish whether the article should be included, considering the defined inclusion criteria, the article was read in its entirety to determine its eligibility.

The criteria for inclusion in the selection of studies were based on the following items: 1 - scientific articles that address biological tests for assessing resistance of sand flies to insecticides; 2 - articles that used a possible SRL of sand flies to insecticides; 3 - articles on standardization of techniques for assessing the susceptibility of sand flies to insecticides and; 4 - articles that indicated parameters for evaluating the susceptibility status of sand flies populations.

The following items were used as exclusion criteria: 1 - articles about insecticides not used to control vectors of medical importance; 2 - articles on sand flies control with insecticides; 3 - articles assessing the residue of insecticides on walls or

mosquito nets; 4 - articles on collars impregnated with insecticides; 5 - articles evaluating immature forms of sand flies and; 6 - articles that dealt with the characterization of susceptibility through biochemical and/or molecular tests of sand flies.

The selection of articles and data extraction was carried out by two independent researchers considering the predefined inclusion and exclusion criteria. After applying the exclusion criteria, all the articles included were categorized and the information about authors, period and place of the study, objectives, target species, type of insecticide, origin of the population, sex, type of methodology, as well as the criteria for resistance classification and conclusions were drawn. In the discussion, no article was excluded because of the quality of the research.

## **Results**

A total of 3481 scientific articles were found in the four databases. After excluding duplicate articles and analyzing the title and summary of the remaining articles, 3406 articles were excluded. 75 articles remained to be fully read, addressing the topic of interest in this review. However, 13 of these articles did not comply with the inclusion criteria and were excluded, ten for evaluating the control of sand flies, two due to the language and one for dealing with biochemical and/or molecular analysis. In addition, three study was not available in the literature and we did not obtain a response from the author after requesting the manuscript. Two articles, not detected in the search through the databases, were added. At the end of the research, 61 articles were selected for the study (Figure 1).

*Sand flies Resistance Status* - Table 1 shows the results of susceptibility/resistance of sand flies. Currently, there are 47 populations of sand flies with confirmed resistance (Figure 2A) for one or more insecticides and another 28 populations considered tolerant (Figure 2B). India is the country with the largest number of resistant populations. With the exception of one population of sand flies in Turkey and another in Egypt, all the other 45 originate from India.

The first record of resistance in sand flies was done in relation to the species *Phlebotomus papatasi*, in 1978, in India, where 80% of the insects exposed to dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) 4% remained alive after one hour of exposure (Kaul et al., 1978). In the following year, Joshi et al. (1979) detected resistance for the species *Ph. papatasi* to organochlorine DDT 4% also in India. This same species was also classified in India as resistant to DDT 4% by Rahman et al. (1982). Dhanda et al. (1983) evaluated two populations of *Ph. papatasi* in India for the insecticides DDT 4% and malathion 5%, and both populations were susceptible to malathion and resistant to DDT, with only 42% mortality. Also in India, Kaul et al. (1993) indicated resistance of *Ph. papatasi* and *Ph. argentipes* to DDT 4%, when the mortality rate for these species was 2% and 15%, respectively. In 1992, in India, Mukhopadhyay et al. (1992) detected resistance in populations of *Ph. argentipes*. Their experiments recorded only 40% mortality when exposed to 4% DDT.

*Sergentomyia shorttii* was the first species of no medical importance to be classified as resistant. Kaul et al. (1994) tested the susceptibility of this sand-fly, in India, to the insecticides DDT 4%, malathion 5% and fenitrothion 1%. Their results showed resistance to DDT with 60% mortality, but high susceptibility to malathion and fenitrothion with 75% a 90% mortality, respectively. Basak and Tandon (1995)

and Das Gupta et al. (1995) recorded populations of *Ph. argentipes* and *Ph. papatasi* resistant to the insecticide DDT 4% in 1995 in India.

Singh et al. (2001), Dhiman et al. (2003), Dinesh et al. (2010) and Singh et al. (2012) also found resistance of *Ph. argentipes* sand-fly populations to DDT. In a large survey of sand-fly susceptibility in India, Singh et al. (2015) assessed 42 villages. In this study, 16 populations of *Ph. argentipes* were resistant to DDT and another 15 were tolerant.

In 1996, *Ph. papatasi* showed resistance to a new class of insecticide: carbamate propoxur 0.1%. In this study, only 44% of sand flies remained alive after an hour of exposure (Bansal et al., 1996). In addition, this population was also resistant to DDT 4% and Dieldrin 0.4%, with mortality rates of 47% and 57% respectively. Also in India, Bansal and Singh (1996) evaluated two species of sand flies, *Ph. papatasi* and *Se. punjabaensis*, in relation to DDT, dieldrin, malathion, fenitrothion, propoxur and permethrin insecticides. The *Ph. papatasi* species was resistant to DDT 4% and dieldrin 0.4% and propoxur 0.1%. Singh and Bansal (1996) exposed two populations of *Ph. papatasi* to DDT 4%, dieldrin 0.8%, malathion 5%, fenitrothion 1% and propoxur 0.1%. Both populations were resistant to DDT.

The first record of sand-fly resistance to organophosphates occurred in 2000 in India. When studying the susceptibility of *Ph. papatasi* sand flies against DDT, dieldrin, malathion and deltamethrin, Dhiman and Mittal (2000) detected resistance to the insecticides DDT, dieldrin and malathion.

In relation to pyrethroids, *Ph. papatasi* registered resistance to permethrin and lambda-cyhalothrin, and tolerance to deltamethrin, while *Ph. argentipes* showed

resistance to deltamethrin and permethrin (Amalraj et al., 1999), both in India. These were the first records of sand-fly resistance to pyrethroid insecticides.

In 2016, Fawaz et al. (2016) performed the first record of sand-fly resistance outside India. In a study carried out in Egypt, the species *Ph. papatasi* was classified as resistant to the pyrethroid permethrin. The following year, in Turkey, Karakus et al. (2017) evaluated a pool of six species of sand flies (*Ph. papatasi*, *Ph. tobbi*, *Ph. neglectus/syriacus*, *Ph. alexandri*, *Se. dentata* and *Se. minuta*). Laboratory bioassays demonstrated resistance to deltamethrin and tolerance to permethrin.

Sardar et al. (2018) evaluated the susceptibility of *Ph. argentipes* in India to the insecticides DDT, deltamethrin and malathion using the WHO tubes methodology. In this study, five sand-fly populations were resistant to DDT. The mortality of these insects varied from 65 to 76%.

Table 1. Main characteristics of the selected studies that report susceptibility and resistance of sand flies to insecticides.

Note: Ph. – *Phlebotomus*; Lu. – *Lutzomyia*; Se. – *Sergentomyia*; WHO – World Health Organization; CDC – Centre for Disease Control and Prevention; S – Susceptible; T – Tolerant; R – Resistant; Un – Uninformed. <sup>a</sup>Two resistant populations; <sup>b</sup>One resistant and one tolerant population; <sup>c</sup>Sixteen resistant and fifteen tolerant populations; <sup>d</sup>One resistant population and six tolerant; <sup>e</sup>Five resistant populations. \*The sand flies were identified after the tests.

**Susceptibility Reference Lineage (SRL)** - Of the 61 studies selected, only two developed comparisons between field sand flies and SRL (Mazzari et al., 1997; Maroli et al., 2002). Two articles report the use of field sand flies as a reference population.

This was done because these insects come from a preserved area and without contact with insecticides (Alexander et al., 2009; Pessoa et al., 2015) (Table 2). Forty-five studies carried out the tests with populations collected directly from the field or with the F1 generation. Another eight studies determined lethal doses (LD), lethal times (LT), dose/time diagnostics (DD or TD) and/or simply verified the susceptibility of colony sand flies to insecticides (Pener et al., 1987; Tetreault et al., 2001; Marceló et al., 2014; Denlinger et al., 2015; Li et al., 2015; Denlinger et al., 2016; Fawaz et al., 2016; Rama et al., 2017). Three other studies used colony populations to assess WHO tubes methodologies (Santamaria et al., 2002) and CDC bottles methodology (Santamaria et al., 2003), while Dinesh et al. (2010) evaluated the susceptibility of fed and non-fed sandflies.

Table 2. Sand fly colonies with potential for Susceptibility Reference Lineage.

Ph. – *Phlebotomus*, Lu. – *Lutzomyia*.

Note: \* Wild sand flies. \*\* Colony replenished frequently. \*\*\* Colony assembled from resistant sand flies

***Sand flies' lethal time and lethal dose*** - LT and LD estimated by different authors to study the susceptibility of field sand flies to insecticides can be seen in Supplements 3 and 4. LT<sub>50</sub> of the species *Ph. argentipes* ranged from 10 min to 77 min for DDT 4% (Mukhopadhyay et al., 1992; Chandra et al., 1995; Rama et al., 2017). For this same product, *Ph. papatasi* presented LT<sub>50</sub> from 16 to 1312 min and LT<sub>90</sub> from 40 to 2025 min. These values are based on tests with WHO impregnated papers (Afshar et al.,



2011; Saeidi et al., 2012; Saeidi et al., 2013; Bidabadi et al., 2017). LT<sub>50</sub> and LT<sub>90</sub> for DDT at 4% of the *Ph. sergenti* species was 8 to 12 min. and 32 to 39 min., respectively (Afshar et al., 2011; Azamani et al., 2017).

Regarding the *Lu. longipalpis* species, Santamaria et al. (2003) obtained values of 24 and 60 min for LT<sub>50</sub> and LT<sub>95</sub>, respectively, using a test of CDC bottles impregnated with lambda-cyhalothrin (10 ug/bottle). In Colombia, groups of 10 to 15 insects of the *Lu. longipalpis* species, not fed, were analyzed using bottles impregnated with the CDC treated with 50, 75, 100 and 150 ug/mL of malathion; 5, 7, 10, 25 and 45 ug/mL of deltamethrin and 3, 5, 10, 15, 25 and 50 ug/mL of lambda-cyhalothrin. The diagnostic doses and times were 75 ug/mL and 25 min. for malathion, 10 ug/mL and 35 min. for deltamethrin and 15 ug/mL and 30 min. for lambda-cyhalothrin (Marceló et al., 2014).

In Brazil, males and females of the *Lu. longipalpis* species collected in Gruta de Lapinha/MG were exposed to malathion (200 ul/bottle) and fenitrothion (800 ug/bottle) in CDC bottle tests, whose LT<sub>50</sub> values were of 20 and 35 min., according to Alexander et al. (2009).

Diagnostic doses above 7.0 ug/mL for Propoxur and Bendiocarb, 7.5 ug/mL for DDT, 4.0 ug/mL for lambda-cyhalothrin, 20.0 ug/mL for cypermethrin and 15.0 ug/mL for deltamethrin were sufficient to produce 100% mortality in 40 min. for the *Lu. longipalpis* and *Ph. papatasi* species (Denlinger et al., 2016).

**Tests for the detection of sand-fly resistance** - The WHO method of impregnated tubes and papers is the most used method for assessing the susceptibility of sand flies to insecticides (55 articles), but it is not the only one available. There is also the test of impregnated bottles from the CDC (6 articles) and some methodologies that adapt

WHO's tubes (3 articles) and cones (1 article). Two mortality criteria are adopted in the studies. The first refers to the total absence of movement (Marceló et al., 2014; Denlinger et al., 2015) while the second considers insects dead when they are unable to stand or fly coordinately (Dhiman et al., 2003; Singh et al., 2015; Rama et al., 2017).

***Tests of sand flies' biological parameters*** - Regardless of the type of methodology adopted, it is noted that there is no standardization regarding sex for in the susceptibility tests. There are studies which evaluated only female sand flies (Falcão, 1963; Kaul et al., 1994; Dinesh et al., 2010), others which used only males (Li et al., 2015), and there are those which mix males and females (Hadjinicolaou et al., 1958; Fahmy et al., 1996; Saeidi et al., 2013).

Some studies used populations collected directly in the field. After capture, they performed procedures for acclimatizing the insects to minimize possible physical damage or stress that could increase the number of deaths, and soon after that they performed the tests (Joshi et al., 1979; Singh and Bansal, 1996; Singh, 2015). Other tests, however, used only the F1 generation of field insects (Schmidt and Schmidt, 1969; Mukhopadhyay et al., 1992; Hassan et al., 2012).

There are studies that compare the nutritional status of insects (Dinesh et al., 2010), that is, whether the feeding of sand flies influences or not their ability to survive exposure to insecticides. There are also studies on the interference of age and generation in the experiments on the susceptibility of sand flies to insecticides (Fawaz et al., 2016). Rama et al. (2015) evaluated the influence of generations on the susceptibility of the *Ph. argentipes* species to DDT, whose peak of resistance (100%) was at F4, gradually decreasing until generation F7.

## Discussion

The main contributions of this systematic review were: a) the panorama of sand-fly resistance revealed 47 populations of sand flies with confirmed resistance, mainly in India; b) of the 61 selected studies, only two studies performed comparisons between field and reference sand flies; c) the lethal doses and times of sand flies used in the studies are very varied; and d) the WHO kit method with impregnated papers is the most utilized to assess the susceptibility of sand flies to insecticide. The last three contributions reveal that there is no specific protocol for assessing the susceptibility of sand flies to insecticides.

*Phlebotomus argentipes* - vector of *Leishmania donovani* and etiological agent of VL in the Indian subcontinent, presented 31 records of resistance to three classes of insecticides, organochlorine (DDT), organophosphate (malathion) and pyrethroids (permethrin and deltamethrin), and another 19 records of tolerance. The species *Ph. papatasi* - vector of *Le. major* and etiological agent of zoonotic cutaneous leishmaniasis in the Old World, has 23 resistance records for the four classes of insecticide, organochlorine (DDT and dieldrin), organophosphates (malathion), pyrethroids (permethrin and lambda-cyhalothrin) and carbamate (propoxur), and 5 records of tolerance to the main insecticides used to control leishmaniasis. The resistance of *Ph. papatasi* to DDT is due to the overlap with areas of malaria, whose control has been carried out since the 1940s (Hadjinicolaou, 1958), while that of *Ph. argentipes* is attributed to the indiscriminate use of DDT in residual household applications (Singh et al., 2004; Ostyn et al., 2008). In addition, there is also a report of resistance of the species *Sergentomyia shortii* - a species of no medical importance. *Ph. sergenti* - vector of *Le. tropica*, etiologic agent of anthroponotic cutaneous

leishmaniasis in the Old World and the sand-fly *Lutzomyia longipalpis* – vector of *Le. infantum*, the etiological agent of visceral leishmaniasis in the New World, proved to be tolerant in susceptibility tests (Azamani et al., 2017; Alexander et al., 2009).

The lack of standardization regarding age, sex and physiological status, associated with the use of different concentrations of insecticide, types of WHO or CDC tests and time of exposure limited the comparisons between published studies. The resistance of sand flies to insecticides is irregular in space, dependent on the species and is not continuous over time.

So far, there is only one protocol for assessing the susceptibility of sand flies recommended by WHO (1981b), with WHO impregnated paper kits. This methodology has limitations (see below) and does not use a Susceptibility Reference Lineage (SRL). One of the major obstacles to the development of studies on susceptibility/resistance to insecticides has been to determine a SRL that can be used in an ample and standardized manner.

The Pan American Health Organization (PAHO) (PAHO, 2005) suggests that SRL should: i) present at least more than five generations raised in laboratory conditions without contact with insecticides; ii) not have new insects added to the colony during the last five generations and iii) the population must not have had contact with insecticides. Among the works that mention the use of colony of sand flies (Table 2) in the characterization of susceptibility to insecticides, two articles made it clear that these populations were not in accordance with the recommendations of PAHO due to two factors: i) routine replacement of biological material (Dinesh et al., 2010) and ii) being formed with possibly resistant populations (Rama et al., 2017).

In Brazil, Alexander et al. (2009) and Pessoa et al. (2015) indicated the population of sand flies coming from Gruta da Lapinha (Lagoa Santa, Minas Gerais) as SRL. This population, although wild, proved to be susceptible to the field bioassays carried out by the authors and meets PAHO criteria.

In opposition, populations of sand flies collected in the field have shown greater susceptibility when compared to populations created in a laboratory. This fact represents the intraspecific variability of insecticide susceptibility tests and, therefore, may make it difficult to compare results derived from wild populations. For example, *Lu. longipalpis* created in a laboratory showed a  $LT_{50}$  of 13.2, while in field populations it was 8.3 for DDT. For malathion it was 10.1 for the laboratory strain, against 7.2 for the field population; and for propoxur it was 11.4 and 6.3 for reference and field populations, respectively (Mazzari et al., 1997). This phenomenon can also be observed for *Ph. argentipes* (Dinesh et al., 2010).

This fact can probably be explained by the greater tolerance to insecticides (Schmidt and Schmidt, 1969) of laboratory populations, whose food is offered more frequently and whose conditions of shelter and protection are better when compared to field conditions. Another factor that could explain the higher mortality in field populations would be that during capture and transport the samples could suffer physical damage or stress that would increase their mortality.

*Lu. longipalpis* raised since 2007 under laboratory conditions were also more resistant than field populations from the municipality of Araçatuba/SP when they were exposed to WHO kits with papers impregnated with lambda-cyhalothrin (0.05%) and deltamethrin (0.5%). The authors suggest not using the F1 generation of field sandflies in susceptibility tests, that is, sand flies collected in the field could be used as control

groups and compared to exposed populations also captured in the wild (González et al., 2019).

The procedures adopted for studies on the susceptibility of the *Anopheles* gender mosquitoes (WHO, 2013), of the *Aedes aegypti* species (WHO 2016a), as well as those for insects of the subfamily Triatominae (Obara et al., 2011) are not the most appropriate ones in terms of using SRL. New criteria and indicators need to be produced to improve the detection of resistant sand-fly populations.

Among the indicators, the Diagnostic Dose (DD) and Lethal Doses (LD) stand out. DD is the lowest dose of a given insecticide that kills 99% of susceptible sand flies within a specific time frame. This way, this indicator can be used qualitatively, that is, identifying individuals from a population that can survive doses that would be lethal for the majority of the population, therefore, high survival rates suggest sand-fly resistance.

For triatomines, the WHO (1994) suggests the DD the LD<sub>99</sub> as SRL. For mosquito larvae, the recommendation is that the DD be doubled, that is, twice the LC<sub>99</sub> of the SRL, according to WHO (2016b). For this, 20 to 25 larvae of 3<sup>rd</sup> and/or 4<sup>th</sup> stages are exposed to 4 to 5 concentrations, in four or more repetitions. After the 24-hour mortality reading, LD are estimated, which result in 50%, 90% and 99% mortality of the SRL. LC<sub>99</sub> is used as a diagnostic concentration DD to test resistance in field populations.

The information on sand flies is scarce and from variable methodologies, as there is no standardization of DD. For example, experiments with *Lu. longipalpis* exposed in CDC bottles for 35 min. presented different DD for the same product (deltamethrin) – 10 µg/mL and 45 µg/mL (Marcelo et al., 2014; Denlinger et al., 2016).

Therefore, it is of fundamental importance to adopt DD for sand flies in laboratory tests to detect alterations of susceptibility in this group of insects.

Resistance Ratios (RR) are also extremely useful for monitoring the evolution of insecticide resistance in a field population. The RR are calculated by dividing the LD<sub>50</sub> or LT<sub>50</sub> of field populations by the LD<sub>50</sub> or LT<sub>50</sub> of the SRL. For triatomines, a RR greater than five implies resistance of the tested population (Obara et al., 2011), while to classify mosquitoes' resistance as low, moderate or highly resistant, RR<sub>95</sub> <5, between 5.0 and 10.0 is and > 10.0, are respectively adopted (Mazzari and Georghiou, 1995). The importance of this criterion to quantify the resistance in populations of field sand flies is emphasized.

Three methods can be used to assess the susceptibility of sand flies to insecticides: the WHO kit of impregnated papers and tubes (WHO, 2013), the WHO cones (Pessoa et al., 2015) and the CDC bottles (Brogdon and McAllister, 1998). It is noted that 34 experiments were conducted using WHO kits of tubes and impregnated papers, five used CDC bottles and one used laboratory bioassays with WHO cones, as shown in Table 1.

The WHO kit of impregnated papers is a tool composed of two tubes joined by a base. On one side the insects rest without contact with the insecticide and on the other they are exposed to the impregnated papers. At the base there is a door that allows the insects to pass from one side to the other. This tool has been used since the 1950s, being the oldest susceptibility assessment method. Limitations such as high cost, escape of sand flies through the tubes' exposure gate and side screens, areas of the tube without the presence of insecticide, and difficulty in observing the insects' behavior

during laboratory bioassays hamper the analysis and monitoring of sand-fly populations (Schmidt and Schmidt, 1969; WHO, 2013).

The CDC bottles bioassay works by impregnating bottles with insecticides diluted in solvent. The insects are introduced into the bottles and the bioassay begins after closing the lids. Although it presents some advantages over the WHO tubes kit, such as low cost, ease of transport, tests with different dosages of insecticides and an exposure area totally covered by insecticide (Santamaria et al., 2003), it also poses disadvantages such as the difficulty of introducing and removing the insects from inside the bottle (Brogdon and Chan, 2010; WHO, 2013), as well as a surface with little adhesion, as in the case of glass, which makes it difficult for the sand flies to rest on the walls of the bottle.

Experiments that aim to evaluate the susceptibility of sand fly populations exposed to organochlorines and pyrethroids, will certainly have difficulties in transferring live specimens to insecticide-free containers. Also, the solvent used can influence the mortality of delicate and smaller species. *Lu. Longipalpis*, for example, is a robust species when compared to most species of the genus *Lutzomyia*, therefore, its recovery of the toxicological effects of the solvent used is faster (Santamaria et al., 2003). In addition, Henriquez et al. (2009) reported repulsion of sand flies in bottles impregnated with lambda-cyhalothrin and deltamethrin diluted with acetone. However, bottles impregnated with the same insecticides mixed with alcohol did not interfere with the behavior of insects.

The cone bioassay can evaluate the residual insecticides on walls, and it can also be used as a method of assessing the susceptibility of sand flies in the laboratory, according Pessoa et al. (2015). In this bioassay, the insects are exposed to insecticide-



treated surfaces and held in place by a transparent plastic cone with paper impregnated with insecticide in the vertical position. Unlike other methods, it simulates the real exposure of sand flies to environments impregnated with insecticide. The disadvantage is that they have insecticide-free areas, such as the opening orifice, where sand flies can rest, without contact with the insecticide (WHO, 1998).

Few studies have evaluated sand-fly resistance separating females and males. Since only females are responsible for the transmission of protozoa of the gender *Leishmania*, part of the few susceptibility studies with this group of insects do not use males. Alexander et al. (2009) showed that male *Lu. longipalpis* are considered more susceptible than females to the insecticides malathion, permethrin and fenitrothion, while females were more susceptible to deltamethrin and lambda-cyhalothrin. Dinesh et al. (2008) found that males of the species *Ph. argentipes* were more susceptible to permethrin compared to females of the same species. These differences could influence the choice of the insecticide used in leishmaniasis control programs, particularly in the case of *Lu. longipalpis* s.l., whose males attracts the females to copulate indicating the location for hematophagy through chemical signals (pheromones, wing flapping) (Soares and Turco, 2003).

Another important parameter is the standardization of the age of the sand flies for insecticide susceptibility bioassays. This standardization can provide greater reliability regarding the mortality rate of the exposed insects, that is, populations collected in the field should be raised in insectaries to obtain the F1 generation or more, which in turn would be used in the experiments (Maroli et al., 2002; Rama et al., 2015). However, the creation of sand flies is a very difficult task and requires a laboratory with adequate infrastructure, good biosafety conditions, and specialists dedicated

almost exclusively to the maintenance of the colonies. This probably accounts for the lack of studies to monitor insecticide resistance.

The number of populations of resistant sand flies could certainly be different if there were a standardization of methodologies and parameters for the existing laboratory bioassays. Still, it would be possible to detect resistance in populations at an early stage, facilitating the decision making of leishmaniasis control programs in relation to the management of insecticides. There is a need for future research that incorporates new exposure methodologies, cut-off points for classification of resistance and mortality criteria to improve the detection of resistance in sand flies.

The CDC bottle methodology has been shown to be the most appropriate for studies on the susceptibility of sand flies. However, we suggest the use of specific SRL for each species in order to estimate DD and/or Diagnostic Time. These parameters must be used to detect populations with alterations in susceptibility, whose RR values will allow the quantification of resistance levels in comparison with SRL.

Our review, though systematic, was subject to several methodological and substantive limitations. Firstly, the variability of the outcome measures encountered for lethal doses, lethal times, diagnostic doses and methodologies limit the comparability of the studies, especially when relating outcomes to insecticide resistance in sand flies. Secondly, we did not develop a systematic review of the biochemical, molecular and field assays for detecting resistance or susceptibility in sand flies. We hope this component will be covered in a separate systematic review. Thirdly, we restricted our review to literature in the English, Spanish and Portuguese languages. However, we are aware that the majority of the research work on resistance has come from a relatively small community of researchers and institutes and since we

adopted this specific search strategy in order to increase sensitivity in the search for susceptibility articles of sand flies, it is unlikely that we may have missed out on any substantive evidence.

## **Conclusions**

Monitoring the resistance of sand-fly populations to insecticides is extremely relevant for the success of leishmaniasis control in the world, since residual spraying is one of the main strategies adopted. We conclude that the experiments to detect sand-fly resistance to insecticides need to be improved through new research to analyze the interference of generation, nutritional status, age, and sex. In order to guarantee a quick and early detection of resistance in sand flies, it is necessary to standardize biological bioassays, associated with biochemical and molecular tests, in order to analyze the mechanisms responsible for the phenotype of resistance of sand flies to insecticides.

## **Supporting information**

Supplement 1. Prisma Checklist

Supplement 2. Search strategy

Supplement 3. Lethal doses and diagnostic doses found in the assessments of sand-fly susceptibility to insecticides.

Supplement 4. Supplement 4. Lethal times and diagnostics times of different insecticides for various species of sand flies tested in susceptibility bioassays.

## **Acknowledgments**

The authors would like to thank Katlen Dayane Alves Soares and Michelle Soares from the University of Brasília for their assistance in bibliographic switching and to Doctor Rodrigo Gurgel Gonçalves for revising the manuscript. This study was also financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Financial code 001 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### **Funding acknowledgement**

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sector. Douglas de Almeida Rocha receives funding from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### **References**

- 1. Aboul Ela, R.G., Morsy, T.A., el-Gozy, B.M., Ragheb, D.A. 1993.** The susceptibility of the Egyptian *Phlebotomus papatasi* to five insecticides. J. Egypt. Soc. Parasitol. 23 (1), 69-94.
- 2. Afshar, A.A., Rassi, Y., Sharifi, I., Abai, M., Oshaghi, M., Yaghoobi-Ershadi, M. et al., 2011.** Susceptibility Status of *Phlebotomus papatasi* and *P. sergenti* (Diptera: Psychodidae) to DDT and Deltamethrin in a Focus of Cutaneous Leishmaniasis after Earthquake Strike in Bam, Iran. Iran. J. Arthropod. Borne. Dis. 5 (2), 32-41.
- 3. Alexander, B., Barros, V.C., de Souza, S.F., Barros, S.S., Teodoro, L.P., Soares, Z. R., et al., 2009.** Susceptibility to chemical insecticides of two Brazilian populations

of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Trop. Med. Int. Health. 14 (10), 1272-7.

**4. Amalraj, D.D., Sivagnaname, N., Srinivasan, R., 1999.** Susceptibility of *Phlebotomus argentipes* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae) to insecticides. J. Commun. Dis. 31 (3), 177-80.

**5. Arzamani, K., Vatandoost, H., Rassi, Y., Abai, M.R., Akhavan, A.A., Alavinia, M., et al., 2017.** Susceptibility status of wild population of *Phlebotomus sergenti* (Diptera: Psychodidae) to different imagicides in a endemic focus of cutaneous leishmaniasis in northeast of Iran. J. Vector. Borne. Dis. 54 (3), 282-6.

**6. Bailey, F., Mondragon-Shem, K., Haines, L.R., Olabi, A., Alorfi, A., Ruiz-Postigo, J. A., et al., 2019.** Cutaneous leishmaniasis and co-morbid major depressive disorder: A systematic review with burden estimates. PLoS. Negl. Trop. Dis. 13 (2), e0007092.

**7. Bansal, S.K., Singh, K.V., 1996.** Susceptibility status of *Phlebotomus papatasi* and *Sergentomyia punjabaensis* (Diptera:Psychodidae) to some insecticides in district Bikaner (Rajasthan). J. Commun. Dis. 28 (1), 28-32.

**8. Basak, B., Tandon, N., 1995.** Observations on susceptibility status of *Phlebotomus argentipes* to DDT in district South 24-Parganas, West Bengal. J. Commun. Dis. 27 (3), 196-7.

- 9. Brogdon, W.G., McAllister, J.C., 1998.** Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 14 (2), 159-164.
- 10. Burza, S., Croft, S.L., Boelaert, M., 2018.** Leishmaniasis. *The Lancet.* 15, 392 (10151) 951-970.
- 11. Chandra, G., Bhattacharya J., Hati, A.K., 1995.** Susceptibility status of *Phlebotomus argentipes* to DDT, dieldrin and malathion in Hoogly, West Bengal. *J. Commun. Dis.* 27 (4), 247-9.
- 12. Chowdhury, R., Das, M.L., Chowdhury, V., Roy, L., Faria, S., Priyanka, J., et al., 2018.** Susceptibility of field-collected *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae) sand flies from Bangladesh and Nepal to different insecticides. *Wellcome Open Res.* 11 (1), 336.
- 13. Das Gupta, R.K, Saxena, N.B., Joshi, R.D., Rao. J.S., 1995.** DDT resistance in *P. papatasi* in Bihar. *J. Commun. Dis.* 27 (2), 124.
- 14. Denlinger, D.S., Creswell, J.A., Anderson, J.L., Reese, C.K., Bernhardt, S.A., 2016.** Diagnostic doses and times for *Phlebotomus papatasi* and *Lutzomyia longipalpis* sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) using the CDC bottle bioassay to assess insecticide resistance. *Parasit. Vectors.* 9, 212.
- 15. Denlinger, D.S., Lozano-Fuentes, S., Lawyer, P.G., Black, W.C., Bernhardt, S.A., 2015.** Assessing Insecticide Susceptibility of Laboratory *Lutzomyia longipalpis*

and *Phlebotomus papatasi* Sand Flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). J. Med. Entomol. 52 (5), 1003-12.

**16. Dhiman, R. C., Mittal, P.K., 2000.** A note on susceptibility status of *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) populations to insecticides. J. Commun. Dis. 32 (1), 65-6.

**17. Dhiman, R.C., Raghavendra, K., Kumar, V., Kesari, S., Kishore, K., 2003.** Susceptibility status of *Phlebotomus argentipes* to insecticides in districts Vaishali and Patna (Bihar). J. Commun. Dis. 35 (1), 49-51.

**18. Dhiman, C., Yadav, R.S., 2016.** Insecticide resistance in phlebotomine sandflies in Southeast Asia with emphasis on the Indian subcontinent. Infect. Dis. Poverty. 5, 106.

**19. Dinesh, D.S., Das, M.L., Picado, A., Roy, L., Rijal, S., Singh, S.P., et al., 2010.** Insecticide susceptibility of *Phlebotomus argentipes* in visceral leishmaniasis endemic districts in India and Nepal. PLoS Negl. Trop. Dis. 4 (10), e859.

**20. Fahmy, A.R., Khater, E.I.M., Sawaf, B., Shehata, M., 1996.** World Health Organization. Division of Control of Tropical D. Insecticide susceptibility, status of field, populations of sandfly *Phlebotomus papatasi* in the Sinai peninsula, Egypt / by Adel R. Fahmy... [et al.].

**21. Falcão, A.R., 1963.** DDT and dieldrin susceptibility of a natural population of *Phlebotomus longipalpis* in Minas Gerais, Brazil. Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop. 15, 411-5.

- 22. Falcão, A.R., Pinto, C.T., Gontijo, C.M., 1988.** Susceptibility of *Lutzomyia longipalpis* to deltamethrin. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 83 (3), 395-6.
- 23. Faraj, C., Ouahabi, S., Adlaoui, E.B., Elkohli, M., Lakraa, EL., Rhazi, M., et al., 2012.** Insecticide susceptibility status of *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* and *Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi* in endemic foci of cutaneous leishmaniasis in Morocco. Parasit. Vectors. 5, 51.
- 24. Fawaz, E.Y., Zayed, A.B., Fahmy, N.T., Villinski, J.T., Hoel, D.F., Diclaro, J.W., 2016.** Pyrethroid Insecticide Resistance Mechanisms in the Adult *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). J. Med. Entomol. 53 (3), 620-8.
- 25. Ghorbani, M., Farhoudi, R., 2018.** Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? Drug. Des. Devel. Ther. 12, 25–40.
- 26. González, M.A., Bell, M.J., Bernhardt, S.A., Brazil, R.P., Dilger, E., Courtenay, O., et al. 2019.** Susceptibility of wild-caught *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sand flies to insecticide after an extended period of exposure in western São Paulo, Brazil. Parasit. Vectors. 12 (1).
- 27. Hadjinicolaou, J., 1958.** Present status of *Phlebotomus* in certain areas of Greece. Bull. World Health Organ. 19 (6), 967-79.
- 28. Hassan, M.M., Widaa, S.O., Osman, O.M., Numiary, M.S.M., Ibrahim, M.A., Abushama, H.M., 2012.** Insecticide resistance in the sand fly, *Phlebotomus papatasi* from Khartoum State, Sudan. Parasit. Vectors. 5, (1).



- 29. Henriquez, C., Pereira, Y., Cochero, S., Bejarano, E.E., 2009.** Dosis diagnóstica y umbral de resistencia de *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae), a dos insecticidas utilizados en salud pública en Colombia: deltametrina y lambdacihalotrina. Rev. Soc. Entomol. Argent. 68 (3-4), 287-294.
- 30. Joshi, G.C., Kaul, S.M., Wattal. B.L., 1979.** Susceptibility of Sandflies to organochlorine insecticides in Bihar (India) - further reports. J. Commun. Dis. 11 (4), 209-13.
- 31. Karakus, M., Gocmen, B., Ozbel, Y., 2017.** Insecticide Susceptibility Status of Wild-Caught Sand Fly Populations Collected from Two Leishmaniasis Endemic Areas in Western Turkey. J. Arthropod Borne Dis. 11 (1), 86-94.
- 32. Karakus, M., Sarikaya, Y., Oguz, G., Dogan, M., Ergan, G., Gunay, F., et al., 2016.** Assessment of diagnostic doses for widely used synthetic pyrethroids (Deltamethrin & Permethrin) in an endemic focus of leishmaniasis in Turkey. Parasit. Vectors. 9 (1), 526.
- 33. Kaul, S.M., Sharma, R.S., Borgohain, B.K., 1994.** D.D.T. resistance in *Sergentomyia shortii* (Diptera: Psychodidae) in Kamrup, Assam--first report in *Sergentomyia* genus. J. Commun. Dis. 26 (2), 100-2.
- 34. Killick-Kendrick, R., 2010.** Education is key to controlling visceral leishmaniasis. Bull. World Health Organ. 88, 11-12.
- 35. Kirk, R., Lewis, D.J., 1949.** The susceptibility of *Phlebotomus* species to DDT. J. Trop. Med. Hyg. 52 (11), 223-5.

- 36. Kumar, V., L. Shankar, S. Kesari, G. S. Bhunia, D. S. Dinesh, R. Mandal, et al. 2015.** Insecticide susceptibility of *Phlebotomus argentipes* & assessment of vector control in two districts of West Bengal, India. Indian J Med Res. 142(2):211-5.
- 37. Lainson, R., Shaw, J.J., 1979.** The role of animals in the epidemiology of South American Leishmaniasis. In Lumsden WHR, Evans DA. Biology of the Kinetoplastidae, Vol. 2, London, New York, San Francisco: Academic Press; 1-116.
- 38. Lavagino, A., Ansaldi, G., 1991.** Susceptibility tests on *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus perfiliewi* wild populations in Sicily. Parassitologia. 33, 349-51.
- 39. Li, A.Y., Perez de Leon, A.A., Linthicum, K.J., Britch, S.C., Bast, J.D., Debboun, M., 2015.** Baseline Susceptibility to Pyrethroid and Organophosphate Insecticides in Two Old World Sand Fly Species (Diptera: Psychodidae). US. Army Med. Dep. J. 3-9.
- 40. Marceló, C., Cabrera, O. L., Santamaría, E., 2014.** Discriminating concentrations for three insecticides used in public health in a *Lutzomyia longipalpis* experimental strain from Colombia. Biomedica. 34 (4), 624-30.
- 41. Maroli, M., Cianchi, T., Bianchi, R., Khoury, C., 2002.** Testing insecticide susceptibility of *Phlebotomus perniciosus* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae) in Italy. Ann. Ist. Super. Sanita. 38 (4), 419-23.
- 42. Mazzarri M.B., Feliciangeli, M.D., Maroli, M., Hernandez, A., Bravo, A., 1997.** Susceptibility of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to selected

insecticides in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Venezuela. J. Am. Mosq. Control Assoc. 13 (4), 335-41.

**43. Mazzari, M.B., Georghiou, G.P., 1995.** Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. J. Am. Mosq. Control Assoc. 11, 315-322.

**44. Mukhopadhyay, A.K., Saxena, N.B.L., Narasimham, M.V.V.L., 1990.** Susceptibility status of *Phlebotomus argentipes* to DDT in some kala-azar endemic areas of Bihar (India). Ind. J. Med. Res. 91, 458-60.

**45. Mukhopadhyay, A.K., Saxena, N.B.L., Narasimham, M.V.V.L., 1992.** World Health Organization. Division of Control of Tropical D. Susceptibility status of *Phlebotomus argentipes* to DDT in some kala-azar-endemic districts of Bihar, India / by A. K. Mukhopadhyay, N. B. L. Saxena and M. V. V. L. Narasimham.

**46. Nandi, J., Chaudhuri, I., Das, C., Mukhopadhyay, A.K., 2016.** Susceptibility status of *Phlebotomus argentipes*, to synthetic pyrethroid insecticides in kala azar endemic parts of Bihar, India in relation to elimination of visceral leishmaniasis. Ind. J. Pub. Health Res. Dev. 7 (4), 36-8.

**47. Obara, M.T., Otrera, V.C.G., Gonçalves, R.G., Santos, J.P., Santalucia, M., Rosa, J.A., et al., 2011.** Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae) ao inseticida deltametrina, na região Centro-Oeste do Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 44 (2), 206-212.

- 48. OPAS. Organização Pan Americana de Saúde. 2005.** II Reunion tecnica latinoamericana de monitoreo de resistencia a insecticidas em triatominos vectores de Chagas. Panamá, 11 a 13 de abril de 2005.
- 49. Ostyn, B., Vanlerberghe, V., Picado, A., Dinesh, D.S., Sundar, S., et al., 2008.** Vector control by insecticide-treated nets in the fight against visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent, what is the evidence? Trop. Med. Int. Health. 13, 1073–85.
- 50. Pener, H., Wilamovsky, A., 1987.** Base-line susceptibility of *Phlebotomus papatasi* to insecticides. Med. Vet. Entomol. 1 (2), 147-9.
- 51. Pessoa, G.C., Lopes, J.V., Rocha, M.F., Pinheiro, L.C., Rosa, A.C., Michalsky, E.M., et al., 2015.** Baseline susceptibility to alpha-cypermethrin in *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) from Lapinha Cave (Brazil). Parasit. Vectors. 8, 469.
- 52. Rahman, S.J., Wattal, B.L., Mathur, K.K., Joshi, G.C., Kumar, K., 1982.** Susceptibility of laboratory reared strain of *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) to organochlorine insecticides. J. Commun. Dis. 14 (2), 122-4.
- 53. Rama, A., Kesari, S., Das, P., Kumar, V., 2017.** Studying DDT Susceptibility at Discriminating Time Intervals Focusing on Maximum Limit of Exposure Time Survived by DDT Resistant *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae): an Investigative Report. Jpn. J. Infect. Dis. 70 (4), 437-41.
- 54. Rashti, M.A., Panah, H.Y., Mohamadi, H.S., Jedari, M., 1992.** Susceptibility of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to DDT in some foci of cutaneous leishmaniasis in Iran. J. Am. Mosq. Control Assoc. 8 (1), 99-100.

- 55. Romero, G.A.S., M., Boelaert., 2010.** Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America - A Systematic Review. PLoS Negl. Trop. Dis. 4 (1), e584.
- 56. Saeidi, Z., Vatandoost, H., Akhavan, A.A., Yaghoobi-Ershadi, M.R., Rassi, Y., Arandian, M.H., et al. 2013.** Baseline insecticide susceptibility data of *Phlebotomus papatasi* in Iran. J. Vector. Borne Dis. 50 (1), 57-61.
- 57. Saeidi, Z., Vatandoost, H., Akhavan, A.A., Yaghoobi-Ershadi, M.R., Rassi, Y., Sheikh, Z., et al., 2012.** Baseline susceptibility of a wild strain of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to DDT and pyrethroids in an endemic focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. Pest. Manag. Sci. 68 (5), 669-75.
- 58. Santamaría, E., Munstermann, L.E., Ferro, C., 2002.** Standardization of the method proposed by the World Health Organization for determining the susceptibility levels of leishmaniasis vectors to insecticides. Biomédica. 22 (2), 211-8.
- 59. Santamaría, E., Munstermann, L.E., Ferro, C., 2003.** Approximation to the CDC method to determine insecticide susceptibility in leishmaniasis vectors. Biomédica. 23 (1), 115-21.
- 60. Sardar, A.A., Saha, P., Chatterjee, M., Bera, D.K., Biswas, P., Maji, D., et al., 2018.** Insecticide susceptibility status of *Phlebotomus argentipes* and polymorphisms in voltage-gated sodium channel (vgsc) gene in Kala-azar endemic areas of West Bengal, India. Acta Trop. 185, 285-93.
- 61. Schmidt, M. L., J. R. Schmidt. 1969.** Insecticide susceptibilities of *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) from Egypt and the Sudan. J Med Entomol. 6 (1), 87-90.

- 62. Shirani-Bidabadi, L., Zahraei-Ramazani, A., Yaghoobi-Ershadi, M.R., Rassi, Y., Akhavan, A.A., Oshaghi, M.A., et al. 2017.** Assessing the insecticide susceptibility status of field population of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in a hyperendemic area of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Esfahan Province, Central Iran. *Acta Trop.* 176, 316-22.
- 63. Singh, K.V., Bansal, S.K., 1996.** Insecticide susceptibility of *Phlebotomus papatasi* to organochlorine, organophosphate & carbamate compounds in some arid areas of western Rajasthan. *Ind. J. Med. Res.* 103, 91-3.
- 64. Singh, R., Das, R.K., Sharma. S.K., 2001.** Resistance of sandflies to DDT in Kala-azar endemic districts of Bihar, India. *Bull. World Health Organ.* 79 (8), 793.
- 65. Singh, R., Kumar, P., 2015.** Susceptibility of the sandfly *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti (Diptera: Psychodidae) to insecticides in endemic areas of visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Jpn. J. Infect. Dis.* 68 (1), 33-7.
- 66. Singh, R.K., Mittal, P.K., Dhiman, R.C., 2012.** Insecticide susceptibility status of *Phlebotomus argentipes*, a vector of visceral leishmaniasis in different foci in three states of India. *J. Vector Borne Dis.* 49 (4), 254-7.
- 67. Soares, R.P.P., Turco, S.J., 2003.** *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 75 (3), 301-330.
- 68. Tetreault, G.E., Zayed, A.E.B.B., Hanafi, H.A., Beavers, G.M., Zeichner, B.C., 2001.** Susceptibility of sand flies to selected insecticides in North Africa and the Middle East. *J. American Mosq. Contr. Assoc.* 17 (1), 23-7.

- 69. WHO. World Health Organization., 1981a.** Instruction for determining the susceptibility of resistance of adult mosquitoes to organochlorines, organophosphate and carbamate insecticides diagnostic test. WHO / VBC/ 81.806
- 70. WHO. World Health Organization., 2016a.** Monitoring and managing insecticide resistance in Aedes mosquito populations. Interim guidance for entomologists. Switzerland: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204588>.
- 71. WHO. World Health Organization., 2016b.** Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes, 2nd ed. Switzerland: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/250677>.
- 72. WHO. World Health Organization., 1981b.** Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult blackflies, sandflies and biting midges to insecticides. (WHO/VBC/81/810). p. 1-5.
- 73. WHO. World Health Organization., 1998.** Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vectors, Bio-efficacy and Persistence of Insecticides on Treated Surfaces: Report of the WHO Informal Consultation. Document WHO/CDS/MAL/98.12. Geneva: WHO.
- 74. WHO. World Health Organization., 2013.** Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. Geneva: WHO.

Table 1. Main characteristics of the selected studies that report susceptibility and resistance of sand flies to insecticides.

Reference	Country	Specie	Insecticide	Origem	Sex	Method	Status
Kirk et al. 1949	Sudan	<i>Ph. clydei</i>	DDT	Field	♂♀	Tube	S
		<i>Ph. papatasi</i>					S
Hadjinicolaou et al. 1958	Greece	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Field	♂♀	Tube	S
			Dieldrin				S
Falcão 1963	Brazil	<i>Lu. longipalpis</i>	DDT	Field	♀	WHO	S
			Dieldrin				S
Zhogolev & Kachanova 1968	Turkmenistan	<i>Ph. papatasi</i>	Chlorpyriphos	Field	♀	WHO	S
			DDT				S
Schmidt & Schmidt 1969	Egypt e Sudan	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Field and Colony (F1)	♀	WHO	S, T
			Dieldrin				S, T
Kaul et al. 1978	India	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Field	♀	WHO	S
			Dieldrin				S



Cont. Table 1. Main characteristics of the selected studies that report susceptibility and resistance of sand flies to insecticides.

Reference	Country	Specie	Insecticide	Origem	Sex	Method	Status
Kaul et al. 1978	India	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Field	♀	WHO	R
			Dieldrin				S
Joshi et al. 1979	India	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Field	♀	WHO	S
			Dieldrin				S
		<i>Ph. papatasi</i>	DDT				R
			Dieldrin				S
Rahman et al. 1982	India	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Field	♀	WHO	R
Dhanda et al. 1983	India	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Field	♀	WHO	R <sup>1</sup>
			Malathion				S
Artemiev et al. 1984	Azerbaijan	<i>Ph. brevis</i>	DDT	Field	♀	WHO	S
		<i>Ph. transcaucasicus</i>					S
Pener et al. 1987	Israel	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Colony	♀	WHO	S

Cont. Table 1. Main characteristics of the selected studies that report susceptibility and resistance of sand flies to insecticides.

Reference	Country	Specie	Insecticide	Origem	Sex	Method	Status
Pener et al. 1987	Israel	<i>Ph. papatasi</i>	Methoxychlor	Colony	♀	WHO	T
			Permethrin				S
Falcão et al. 1988	Brazil	<i>Lu. longipalpis</i>	Deltamethrin	Field	♀	WHO	S
Mukhopadhyay et al. 1990	India	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Field	♀	WHO	T
			DDT				S
Lavagino & Ansaldi 1991	Italy	<i>Ph. perniciosus</i>	Malathion	Field	♀	WHO	S
			Permethrin				S
		<i>Ph. perfiliewi</i>	DDT	Field	♀	WHO	S
			Malathion				S
Mukhopadhyay et al. 1992	India	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Field and Colony (F1)	♀	WHO	R
			Permethrin	S			
Rashti et al. 1992	Iran	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Field	♀	WHO	S

Cont. Table 1. Main characteristics of the selected studies that report susceptibility and resistance of sand flies to insecticides.

Reference	Country	Specie	Insecticide	Origem	Sex	Method	Status
Aboul Ela et al. 1993	Egypt	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Field	♀	WHO	S
			BHC				S
			Permethrin				S
			Malathion				S
			Propoxur				S
Kaul et al. 1993	India	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Field	♀	WHO	R
		<i>Ph. papatasi</i>					R
Kaul et al. 1994	India	<i>Se. shorttii</i>	DDT	Field	♀	WHO	R
			Malathion				S
			Fenitrothion				S
Basak & Tandon 1995	India	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Field	♀	WHO	R
Chandra et al. 1995	India	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Field	♀	WHO	S

Cont. Table 1. Main characteristics of the selected studies that report susceptibility and resistance of sand flies to insecticides.

Reference	Country	Specie	Insecticide	Origem	Sex	Method	Status
Chandra et al. 1995	India	<i>Ph. argentipes</i>	Dieldrin	Field	♀	WHO	S
			Malathion				S
Das Gupta et al. 1995	India	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Field	♀	WHO	R <sup>2</sup>
Bansal & Singh 1996	India	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Field	♀	WHO	R
			Dieldrin				R
			Malathion				S
			Fenitrothion				S
			Propoxur				R
			Permethrin				S
Bansal & Singh 1996b	India	<i>Se. punjabaensis</i>	DDT	Field	♀	WHO	S
			Dieldrin				S
			Malathion				S

Cont. Table 1. Main characteristics of the selected studies that report susceptibility and resistance of sand flies to insecticides.

Reference	Country	Specie	Insecticide	Origem	Sex	Method	Status
Bansal & Singh 1996b	India	<i>Se. punjabaensis</i>	Fenitrothion	Field	♀	WHO	S
			Propoxur				S
			Permethrin				S
Fahmy et al. 1996	Egypt	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Field	♂♀	WHO	S
			Dieldrin				S
			Malathion				S
			Propoxur				S
			Deltamethrin				S
Singh & Bansal 1996	India	<i>Ph. papatasi</i>	Permethrin	Field	♀	WHO	S
			DDT				R <sup>3</sup>
			Malathion				S

Cont. Table 1. Main characteristics of the selected studies that report susceptibility and resistance of sand flies to insecticides.

Reference	Country	Specie	Insecticide	Origem	Sex	Method	Status
Singh & Bansal 1996	India	<i>Ph. papatasi</i>	Fenitrothion	Field	♀	WHO	S
			Propoxur				S
			DDT				S
			Propoxur				S
			Malathion				S
Mazzarri et al. 1997	Venezuela	<i>Lu. longipalpis</i>	Fenitrothion	Field vs Colony	♀	WHO	T
			Pirimiphos				T
			Deltamethrin				S
			Lambda-cyhalothrin				S
			Permethrin				S
Amalraj et al. 1999	India	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Field	♂♀	WHO	T
			BHC				T

Cont. Table 1. Main characteristics of the selected studies that report susceptibility and resistance of sand flies to insecticides.

Reference	Country	Specie	Insecticide	Origem	Sex	Method	Status	
Amalraj et al. 1999	India	<i>Ph. argentipes</i>	Malathion				T	
			Deltamethrin				R	
			Permethrin	Field	♂♀	WHO	R	
			Lambda-cyhalothyn				T	
			Bendiocarb				S	
		<i>Ph. papatasi</i>	DDT					T
			BHC					S
			Malathion					T
			Deltamethrin					T
			Permethrin					R
Lambda-cyhalothyn					R			
Bendiocarb					S			

Cont. Table 1. Main characteristics of the selected studies that report susceptibility and resistance of sand flies to insecticides.

Reference	Country	Specie	Insecticide	Origem	Sex	Method	Status
Dhiman & Mittal 2000	India	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Field	♀	WHO	R <sup>4</sup>
			Dieldrin				R
			Malathion				R
			Deltamethrin				S
Singh et al. 2001	India	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Field	♀	WHO	R <sup>5</sup>
Tetrealt et al. 2001	Djibouti e Egypt	<i>Ph. bergeroti</i> <i>Ph. langeroni</i> <i>Ph. sergenti</i> <i>Ph. papatasi</i>	Cyfluthrin	Colony	♀	WHO	S
			DDT				S
			Malathion				S
			Permethrin				S
			Resmethrin				S
Maroli et al. 2002	Italy	<i>Ph. papatasi</i> <i>Ph. perniciosus</i>	DDT	Field x Colony	♀	WHO	S
			Lambda-cyhalothyn				S



Cont. Table 1. Main characteristics of the selected studies that report susceptibility and resistance of sand flies to insecticides.

Reference	Country	Specie	Insecticide	Origem	Sex	Method	Status
Maroli et al. 2002	Italy	<i>Ph. papatasi</i>	Permethrin	Field x Colony	♀	WHO	S
		<i>Lu. longipalpis</i>		Colony			S
Santamaria et al. 2002	Colombia	<i>Lu. serrana</i>	Solvents	Colony	♀	WHO	S
		<i>Lu. quasitownsendi</i>		Field			S
Santamaria et al. 2003	Colombia	<i>Lu. longipalpis</i>	Lambda-cyhalothyn	Colony	♀	CDC	S
			DDT				R
Dhiman et al. 2003	India	<i>Ph. argentipes</i>	Deltamethrin	Field	♂♀	WHO	S
			Malathion				S
Alvarez et al. 2006	Venezuela	<i>Lu. evansi</i>	Lambda-cyhalothyn	Field	♀	WHO	S
			Fenitrothion				S
Alexander et al. 2009	Brazil	<i>Lu. longipalpis</i>	Fenitrothion	Field	♂♀	WHO <sup>e</sup> CDC	S
			Malathion				S

Cont. Table 1. Main characteristics of the selected studies that report susceptibility and resistance of sand flies to insecticides.

Reference	Country	Specie	Insecticide	Origem	Sex	Method	Status
Alexander et al. 2009	Brazil	<i>Lu. longipalpis</i>	Permethrin	Field	♂♀	WHO <sup>e</sup> CDC	T
			Deltamethrin				T
			Lambda-cyhalothyn				S
Henriquez et al. 2009	Colombia	<i>Lu. evansi</i>	Deltamethrin	Field	♀	CDC	S
			Lambda-cyhalothyn				S
Dinesh et al. 2010	India e Nepal	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Colony and Field	♀	WHO	R
			Deltamethrin				S
Afshar et al. 2011	Iran	<i>Ph. papatasi</i> <i>Ph. sergenti</i>	DDT	Field	♂♀	WHO	S
			Deltamethrin				S
Faraj et al. 2012	Marocco	<i>Ph. sergenti</i>	Lambda-cyhalothyn	Field	♂♀	WHO	S
			DDT				S
			Malathion				S

Cont. Table 1. Main characteristics of the selected studies that report susceptibility and resistance of sand flies to insecticides.

Reference	Country	Specie	Insecticide	Origem	Sex	Method	Status
Hassan et al. 2012	Sudan	<i>Ph. papatasi</i>	Permethrin	Field and Colony (F1)	♀	WHO	S
			DDT				S
			Malathion				S
			Propoxur				S
Saeidi et al. 2012	Iran	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Field	♂♀	WHO	T
			Permethrin				S
			Deltamethrin				S
			Cyfluthrin				S
Singh et al. 2012	India	<i>Ph. argentipes</i>	Lambda-cyhalothyn	Field	♀	WHO	S
			DDT				R
			Malathion				S
			Deltamethrin				S

Cont. Table 1. Main characteristics of the selected studies that report susceptibility and resistance of sand flies to insecticides.

Reference	Country	Specie	Insecticide	Origem	Sex	Method	Status
Saeidi et al. 2013	Iran	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Field and Colony (F1)	♂♀	WHO	S
			Permethrin				S
			Deltamethrin				S
			Cyfluthrin				S
			Lambda-cyhalothyn				S
Marceló et al. 2014	Colombia	<i>Lu. longipalpis</i>	Malathion	Colony	♀	CDC	S
			Deltamethrin				S
			Lambda-cyhalothyn				S
Denlinger et al. 2015	United States	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Ph. papatasi</i>	Cypermethrin	Colony	♂♀	WHO	S
			Deltamethrin				S
			Lambda-cyhalothyn				S
			Permethrin				S

Cont. Table 1. Main characteristics of the selected studies that report susceptibility and resistance of sand flies to insecticides.

Reference	Country	Specie	Insecticide	Origem	Sex	Method	Status
Denlinger et al. 2015	United States	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Ph. papatasi</i>	Chlorpyriphos	Colony	♂♀	WHO	S
			Fenitrothion				S
			Malathion				S
			Bendiocarb				S
			Propoxur				S
			DDT				S
Kumar et al. 2015	India	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Field	♀	WHO	R
Li et al. 2015	United States	<i>Ph. papatasi</i> <i>Ph. duboscqi</i>	Cypermethrin	Colony	♂	Tube	S
			Deltamethrin				S
			Cyfluthrin				S
			Lambda-cyhalothyn				S
			Permethrin				S

Cont. Table 1. Main characteristics of the selected studies that report susceptibility and resistance of sand flies to insecticides.

Reference	Country	Specie	Insecticide	Origem	Sex	Method	Status
Li et al. 2015	United States	<i>Ph. papatasi</i> <i>Ph. duboscqi</i>	Pralethrin	Colony	♂	Tube	S
			Chlorpyriphos				S
			Coumaphos				S
			Diazinon				S
			Dichlorvos				S
			Etofenprox				S
			Carbaryl				S
		Malathion	S				
Pessoa et al. 2015	Brazil	<i>Lu. longipalpis</i>	Alfa-cypemethrin	Field	♀	Cone	S
Singh et al. 2015	India	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Field	♀	WHO	R, T <sup>6</sup>
			Malathion				R, T <sup>7</sup>
			Deltamethrin				S

Cont. Table 1. Main characteristics of the selected studies that report susceptibility and resistance of sand flies to insecticides.

Reference	Country	Specie	Insecticide	Origen	Sex	Method	Status
Denlinger et al. 2016	United States	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Ph. papatasi</i>	Chlorpyriphos	Colony	♂♀	CDC	S
			Fenitrothion				S
			Malathion				S
			Bendiocarb				S
			Propoxur				S
			Cypermethrin				S
			Deltamethrin				S
			Lambda-cyhalothyn				S
			Permethrin				S
	DDT	S					
Fawaz et al. 2016	Egypt	<i>Ph. papatasi</i>	Permethrin	Colony	♀	CDC	S
				Field			R

Cont. Table 1. Main characteristics of the selected studies that report susceptibility and resistance of sand flies to insecticides.

Reference	Country	Specie	Insecticide	Origem	Sex	Method	Status
Nandi et al. 2016	India	<i>Ph. argentipes</i>	Deltamethrin	Field	♀	WHO	S
			Lambda-cyhalothyn				S
			Alfa-cypermethrin				S
Karakus et al. 2016	Turkey	Phlebotominae	Deltamethrin	Field	♀	WHO	S
			Permethrin				S
Azamani et al. 2017	Iran	<i>Ph. sergenti</i>	DDT	Field	♀	WHO	T
			Bendiocarb				T
			Permethrin				T
Karaku et al. 2017	Turkey	Phlebotominae	Deltamethrin	Field	♀	WHO	R
			Permethrin				T
Rama et al. 2017	India	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	Colony	♂♀	WHO	S
Bidabadi et al. 2017	Iran	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	Field	♂♀	WHO	T



Cont. Table 1. Main characteristics of the selected studies that report susceptibility and resistance of sand flies to insecticides.

Reference	Country	Specie	Insecticide	Origem	Sex	Method	Status
Bidabadi et al. 2017	Iran	<i>Ph. papatasi</i>	Permethrin	Field	♂♀	WHO	S
			Deltamethrin				S
			Cyfluthrin				S
			Lambda-cyhalothyn				S
Chowdhury et al. 2018	Bangladesh e Nepal	<i>Ph. argentipes</i>	Alfa-cypermethrin	Field	♀	WHO	S
			Deltamethrin				S
			Lambda-cyhalothyn				S
			Permethrin				S
			Malathion				S
Sardar et al. 2018	India	<i>Ph. argentipes</i>	Bendiocarb	Field	♂♀	WHO	S
			DDT				R <sup>8</sup>
			Malathion				S

Cont. Table 1. Main characteristics of the selected studies that report susceptibility and resistance of sand flies to insecticides.

Reference	Country	Specie	Insecticide	Origem	Sex	Method	Status
Gonzalez et al. 2019	Brazil	<i>Lu. longipalpis</i>	Deltamethrin	Field	♂♀	WHO	S
			Lambda-cyhalothyn				S

Note: Ph. – *Phlebotomus*; Lu. – *Lutzomyia*; Se. – *Sergentomyia*; WHO – World Health Organization; CDC – Centre for Disease Control and Prevention; S – Susceptible; T – Tolerant; R – Resistant; Un – Uninformed. <sup>a</sup>Two resistant populations; <sup>b</sup>One resistant and one tolerant population; <sup>c</sup>Sixteen resistant and fifteen tolerant populations; <sup>d</sup>One resistant population and six tolerant; <sup>e</sup>Five resistant populations. \*The sand flies were identified after the tests.

Table 2. Sand fly colonies with potential for Susceptibility Reference Lineage.

Reference	Specie	Year	Source	Breeding place
Pener et al. 1987	<i>Ph. papatasi</i>	1983	Israel	Entomology laboratory, Ministry of Health, Jerusalem, Israel
Mazzari et al. 1997	<i>Lu. longipalpis</i>	1994	Venezuela	University of Carabobo, Carabobo, Venezuela
Tetreault et al. 2001	<i>Ph. papatasi</i>	1989	Egypt	United State Naval Medical Research Unit Number Three, Cairo, Egypt
	<i>Ph. sergenti</i>	1996		
Maroli et al. 2002	<i>Ph. papatasi</i>	1990	Italy	NI
Santamaria et al. 2002	<i>Lu. longipalpis</i>	NI	Colombia	NI
	<i>Lu. serrana</i>	NI		NI
Santamria et al. 2003	<i>Lu. longipalpis</i>	1994	Colombia	NI
Alexander et al. 2009	<i>Lu. longipalpis</i>	NI	Brazil	Lapinha Cave, Minas Gerais, Brasil*
Dinesh et al. 2010*	<i>Ph. argentipes</i>	NI	India	Rajendra Memorial Research Institute of Medical Sciences, Bihar, India
Marceló et al. 2014	<i>Lu. longipalpis</i>	1995	Colombia	Entomology Group of the National Institute of Health, Bogota, Colombia
Denlinger et al. 2015	<i>Lu. longipalpis</i>	80s	NI	Utah State University, Utah, United States of America
	<i>Ph. papatasi</i>	80s	NI	

Table 2. Sand fly colonies with potential for Susceptibility Reference Lineage.

Reference	Specie	Year	Source	Breeding place
Li et al. 2015	<i>Ph. papatasi</i>	NI	United States	Livestock Insect Research Laboratory, Kerrville, Texas, United States
	<i>Ph. duboscqi</i>	NI	Kenya	Army Medical Research Unit, Nairobi, Kenya
Pessoa et al. 2015	<i>Lu. longipalpis</i>	NI	Brazil	Lapinha Cave, Minas Gerais, Brasil*
Denlinger et al. 2016	<i>Lu. longipalpis</i>	80s	NI	Utah State University, Utah, United States of America
	<i>Ph. papatasi</i>	80s	NI	
Fawaz et al. 2016	<i>Ph. papatasi</i>	1994	Egypt	NAMRU-3 Vector Biology Research Program, Cairo, Egypt
Rama et al. 2017**	<i>Ph. argentipes</i>	2014	India	Rajendra Memorial Research Institute of Medical Sciences, Bihar, India

Table 2. Sandfly colonies with potential for Susceptibility Reference Lineage.

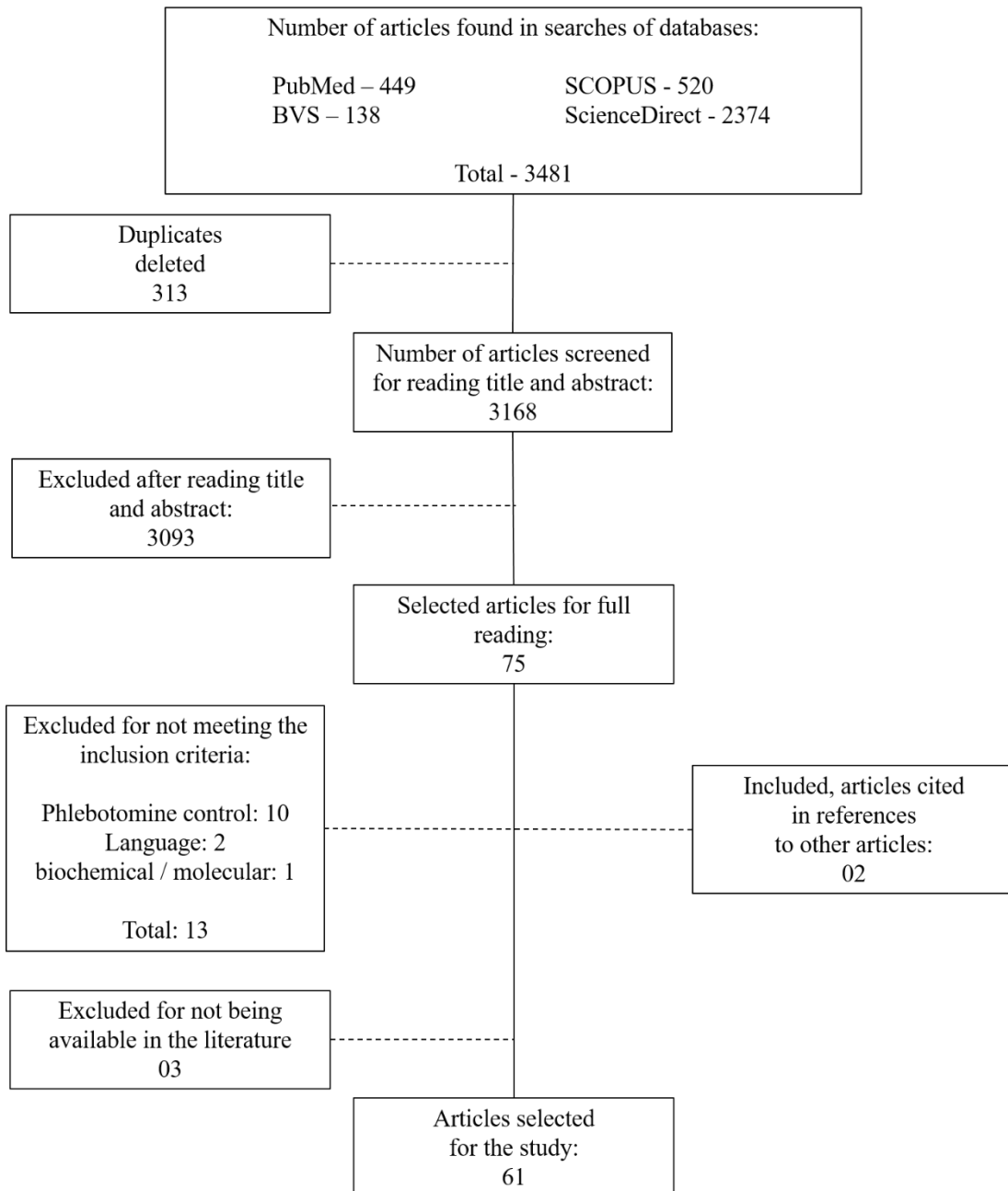
Ph. – *Phlebotomus*; Lu. – *Lutzomyia*; NI - Not identified.

\* Wild sandflies

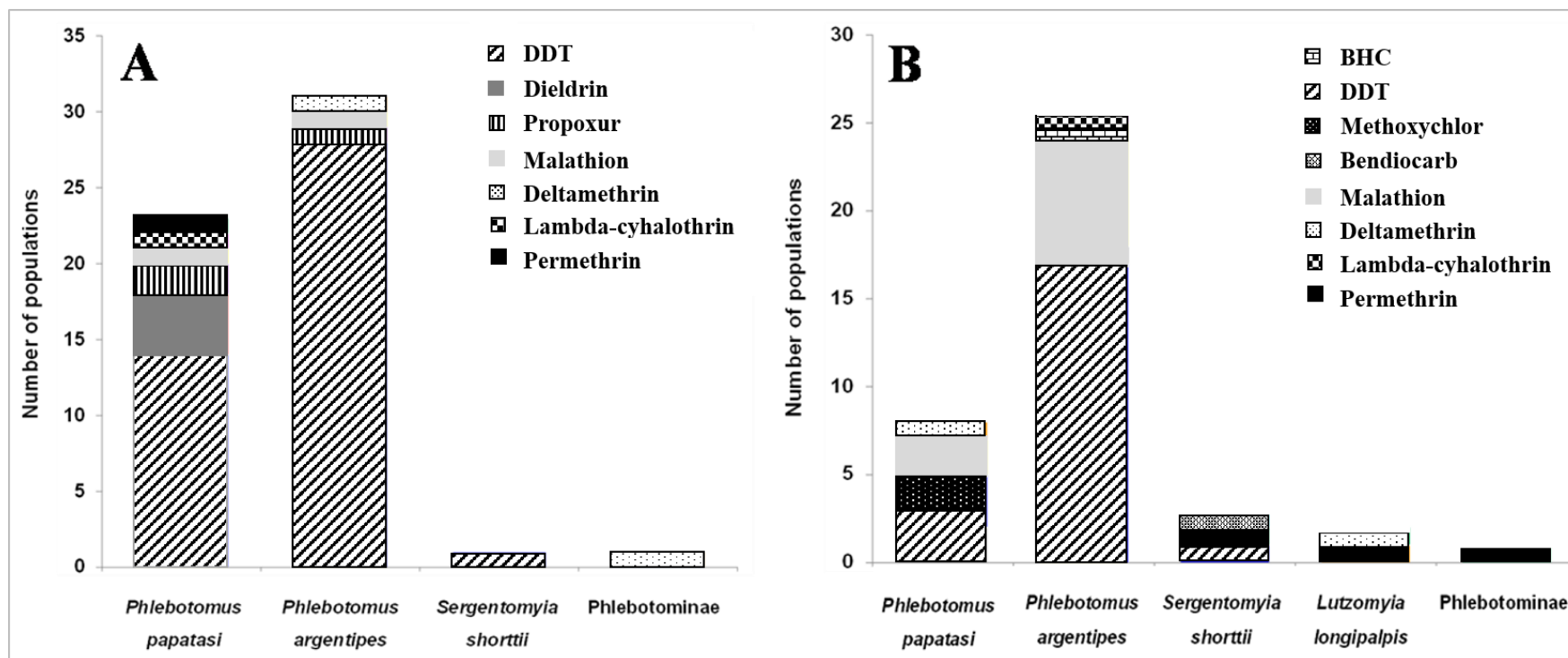
\*\* Colony replenished frequently

\*\*\* Colony assembled from resistant sandflies

**Figure 1** - Flowchart of inclusion and exclusion of studies regarding the laboratory bioassays of susceptibility/resistance of sand flies.



**Figure 2** – Distribution of insects of the sand fly subfamily (Diptera: Pshycodidade) according to resistance or tolerance for different classes of insecticides, in 2019. A: Resistance confirmed. B: Tolerant to insecticides.



Supplement 1. Checklist PRISMA

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
<b>TITLE</b>			
Title	1	Identify the report as a systematic review, meta-analysis, or both.	1
<b>ABSTRACT</b>			
Structured summary	2	Provide a structured summary including, as applicable: background; objectives; data sources; study eligibility criteria, participants, and interventions; study appraisal and synthesis methods; results; limitations; conclusions and implications of key findings; systematic review registration number.	1
<b>INTRODUCTION</b>			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of what is already known.	01/mar
Objectives	4	Provide an explicit statement of questions being addressed with reference to participants, interventions, comparisons, outcomes, and study design (PICOS).	3
<b>METHODS</b>			
Protocol and registration	5	Indicate if a review protocol exists, if and where it can be accessed (e.g., Web address), and, if available, provide registration information including registration number.	NA
Eligibility criteria	6	Specify study characteristics (e.g., PICOS, length of follow-up) and report characteristics (e.g., years considered, language, publication status) used as criteria for eligibility, giving rationale.	03/mai

Cont. Supplement 1. Checklist PRISMA

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
Information sources	7	Describe all information sources (e.g., databases with dates of coverage, contact with study authors to identify additional studies) in the search and date last searched.	3
Search	8	Present full electronic search strategy for at least one database, including any limits used, such that it could be repeated.	4 (Sup 1)
Study selection	9	State the process for selecting studies (i.e., screening, eligibility, included in systematic review, and, if applicable, included in the meta-analysis).	4, 5
Data collection process	10	Describe method of data extraction from reports (e.g., piloted forms, independently, in duplicate) and any processes for obtaining and confirming data from investigators.	4, 5
Data items	11	List and define all variables for which data were sought (e.g., PICOS, funding sources) and any assumptions and simplifications made.	6, 10
Risk of bias in individual studies	12	Describe methods used for assessing risk of bias of individual studies (including specification of whether this was done at the study or outcome level), and how this information is to be used in any data synthesis.	NA
Summary measures	13	State the principal summary measures (e.g., risk ratio, difference in means).	30, 31
Synthesis of results	14	Describe the methods of handling data and combining results of studies, if done, including measures of consistency (e.g., $I^2$ for each meta-analysis).	NA
Risk of bias across studies	15	Specify any assessment of risk of bias that may affect the cumulative evidence (e.g., publication bias, selective reporting within studies).	NA
Additional analyses	16	Describe methods of additional analyses (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression), if done, indicating which were pre-specified.	NA



Cont. Supplement 1. Checklist PRISMA

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
<b>RESULTS</b>			
Study selection	17	Give numbers of studies screened, assessed for eligibility, and included in the review, with reasons for exclusions at each stage, ideally with a flow diagram.	6
Study characteristics	18	For each study, present characteristics for which data were extracted (e.g., study size, PICOS, follow-up period) and provide the citations.	11-14 Tab 1
Risk of bias within studies	19	Present data on risk of bias of each study and, if available, any outcome level assessment (see item 12).	NA
Results of individual studies	20	For all outcomes considered (benefits or harms), present, for each study: (a) simple summary data for each intervention group (b) effect estimates and confidence intervals, ideally with a forest plot.	NA
Synthesis of results	21	Present results of each meta-analysis done, including confidence intervals and measures of consistency.	NA
Risk of bias across studies	22	Present results of any assessment of risk of bias across studies (see Item 15).	NA
Additional analysis	23	Give results of additional analyses, if done (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression [see Item 16]).	NA
<b>DISCUSSION</b>			
Summary of evidence	24	Summarize the main findings including the strength of evidence for each main outcome; consider their relevance to key groups (e.g., healthcare providers, users, and policy makers).	28-29
Limitations	25	Discuss limitations at study and outcome level (e.g., risk of bias), and at review-level (e.g., incomplete retrieval of identified research, reporting bias).	33

Cont. Supplement 1. Checklist PRISMA

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
Conclusions	26	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence, and implications for future research.	18
<b>FUNDING</b>			
Funding	27	Describe sources of funding for the systematic review and other support (e.g., supply of data); role of funders for the systematic review.	34

Supplement 2. MesH descriptors and terms used in the systematic search strategy for phlebotomine susceptibility studies to insecticides.

Pubmed

((("lutzomyia"[All Fields] OR "phlebotomus"[All Fields]) AND "insecticide"[All Fields]) AND "insecticide resistance"[All Fields]) OR "insecticide susceptibility"[All Fields]

Scopus

( ALL ( lutzomyia ) OR ALL ( phlebotomus ) AND ALL ( insecticide ) AND ALL ( "insecticide resistance" ) OR ALL ( "insecticide susceptibility" ))

BVS

tw:((tw:("lutzomyia")) OR (tw:("phlebotomus"))) AND (tw:("insecticide")) AND (tw:("insecticide resistance")) OR (tw:("insecticide susceptibility")))

ScienceDirect

lutzomyia OR phlebotomus AND insecticide AND "insecticide resistance" OR "insecticide susceptibility"

Supplement 3. Lethal doses and diagnostic doses found in the assessments of sand-fly susceptibility to insecticides.

Reference	Specie	Insecticide	LD <sub>50</sub>	LD <sub>90</sub>	LD <sub>95</sub>	LD <sub>99</sub>	DD
Hadjinicolaou (1958) (%)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	0.28				
			0.75				
		Dieldrin	0.2				
			0.2				
Falcão (1963) (%)	<i>Lu. longipalpis</i>	DDT	0.55				
		Dieldrin	0.24				
Schmidt and Schmidt (1969) (%)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	1.03				
			0.8				
			0.96				
			1.5				
			1.01				
			0.97				
		Dieldrin	1.93				
			1.4				
			0.63				
			0.8				
			0.72				
			1.07				
1.03							
0.95							
0.9							

Cont. Supplement 3. Lethal doses and diagnostic doses found in the assessments of sand-fly susceptibility to insecticides.

Reference	Specie	Insecticide	LD <sub>50</sub>	LD <sub>90</sub>	LD <sub>95</sub>	LD <sub>99</sub>	DD
Schmidt and Schmidt (1969) (%)	<i>Ph. papatasi</i>	Dieldrin	0.48				
			0.42				
			0.47				
Kaul et al. (1978) (%)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	0.6				
		Dieldrin	0.1				
	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	2-2.8				
		Dieldrin	0.1				
Joshi et al. (1979) (%)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	> 4				
		Dieldrin	0.32				
	<i>Ph. argentipes</i>	DDT	0.48				
		Dieldrin	0.16				
Pener et al. (1987) (%)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	1.21	2.6			
		Methoxychlor	0.93	4.3			
		Permethrin	0.04	0.08			
Falcão et al. (1988) (%)	<i>Lu. longipalpis</i>	Deltamethrin	< 0.01				
Rashti et al. (1992) (%)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	2.25				
			1.7				
			3,00				

Cont. Supplement 3. Lethal doses and diagnostic doses found in the assessments of sand-fly susceptibility to insecticides.

Reference	Specie	Insecticide	LD <sub>50</sub>	LD <sub>90</sub>	LD <sub>95</sub>	LD <sub>99</sub>	DD
Rashti et al. (1992) (%)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	2.6				
			2,00				
			0.77				
Fahmy et al. (1996) (%)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	1.7				
		Dieldrin	0.4		2.5		
Singh and Bansal (1996) (%)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT	0.12		1.4		
		Dieldrin	1.23		10.83		
Tetreault et al. (2001) mg AL/mL	<i>Ph. bergeroti</i>	DDT	0.14		0.62		
		Bendiocarb	1.1	3052,00		6992,00	
		Malathion	0.05	0.11		0.18	
		Cyfluthrin	0.4	0.76		1256,00	
		Permethrin	0.04	0.16		0.45	
		Resmethrin	0.28	0.57		1002,00	
	<i>Ph. langeroni</i>	DDT	0.02	0.07		0.16	
		Bendiocarb	1.88	6970,00		20.25	
		Malathion	0.12	0.39		0.96	
		Cyfluthrin	0.3	0.7		1380,00	
		Permethrin	0.03	0.2		0.82	
	<i>Ph. sergenti</i>	Resmethrin	0.28	0.42		0.56	
		DDT	0.12	2519,00		-	
		Bendiocarb	3.28	6266,00		10.6	
			0.05	0.1		0.16	

Cont. Supplement 3. Lethal doses and diagnostic doses found in the assessments of sand-fly susceptibility to insecticides.

Reference	Specie	Insecticide	LD <sub>50</sub>	LD <sub>90</sub>	LD <sub>95</sub>	LD <sub>99</sub>	DD
Tetreault et al. (2001) mg AL/mL	<i>Ph. Sergenti</i>	Malathion	0.49	1231,00		2568,00	
		Cyfluthrin	0.05	0.11		0.21	
		Permethrin	0.38	0.86		1662,00	
		Resmethrin	0.06	0.11		0.16	
		DDT	0.94	2130,00		4139,00	
	<i>Ph. papatasi</i>	Bendiocarb	0.05	0.1		0.18	
		Malathion	0.54	1231,00		2383,00	
		Cyfluthrin	0.03	0.2		0.77	
		Permethrin	0.36	0.63		0.99	
		Resmethrin	0.03	0.13		0.34	
Alvarez et al. (2006) (%)	<i>Lu. evansi</i>	Fenitrothion	0.012		0.052		
		Lambda-cyhalothin	0.012		0.012		
Denlinger et al. (2015) ug/bottle	<i>Lu. longipalpis</i>	DDT	28.36	218.58	437.68		
		Bendiocarb	0.98	38.96	136.04		
		Chlorpyrifos	0.45	5.73	13.53		
		Fenitrothion	0.34	2.65	5.3		
		Malathion	8.43	13.81	16.34		
		Propoxur	3.83	75.44	207.76		
		Cypermethrin	8.95	41.85	70.7		
		Deltamethrin	0.92	28.7	92.43		
		Lambda-cyhalothin	0.23	5,00	14.21		

Cont. Supplement 3. Lethal doses and diagnostic doses found in the assessments of sand-fly susceptibility to insecticides.

Reference	Specie	Insecticide	LD <sub>50</sub>	LD <sub>90</sub>	LD <sub>95</sub>	LD <sub>99</sub>	DD
Denlinger et al. (2015) ug/bottle	<i>Lu. longipalpis</i>	Permethrin	17.06	82.4	140.75		
		DDT	15.04	295.97	815.17		
		Bendiocarb	0.28	2.5	5.22		
		Chlorpyrifos	0.32	6.41	17.65		
	<i>Ph. papatasi</i>	Fenitrothion	1.36	7.33	13,00		
		Malathion	20.01	77,00	121.77		
		Propoxur	5.5	39.13	76.26		
		Cypermethrin	8.89	73.27	150.01		
		Deltamethrin	9.9	90.24	191.29		
		Lambda-cyhalothin	0.26	3.65	8.87		
Pessoa et al. (2015) mg/m <sup>2</sup>	<i>Lu. longipalpis</i>	Permethrin	41.34	188.57	315.95		
		Alpha-cypermethrin	0.78		10.55	31.06	
Denlinger et al. (2016) ug/mL	<i>Lu. longipalpis</i>	DDT					7.5
		Bendiocarb					6,00
							5,00
		Chlorpyrifos					25,00
		Fenitrothion					20,00
		Malathion					32,00
						30,00	
						40,00	



Cont. Supplement 3. Lethal doses and diagnostic doses found in the assessments of sand-fly susceptibility to insecticides.

Reference	Specie	Insecticide	LD <sub>50</sub>	LD <sub>90</sub>	LD <sub>95</sub>	LD <sub>99</sub>	DD
Denlinger et al. (2016) ug/mL	<i>Lu. longipalpis</i>	Propoxur					3,00
							2,00
		Cypermethrin					20,00
							10,00
							45,00
	<i>Ph. papatasi</i>	Deltamethrin					15,00
							5,00
		Lambda-cyhalothin					4,00
							3,00
							1,00
	<i>Ph. papatasi</i>	Permethrin					15,00
							7.5
		DDT					2,00
							1,00
							30,00
<i>Ph. papatasi</i>	Chlorpyrifos					30,00	
						30,00	
	Fenitrothion					130,00	
						3,00	
						2,00	
<i>Ph. papatasi</i>	Propoxur					95,00	
						65,00	
<i>Ph. papatasi</i>	Cypermethrin					95,00	
						65,00	

Cont. Supplement 3. Lethal doses and diagnostic doses found in the assessments of sand-fly susceptibility to insecticides.

Reference	Specie	Insecticide	LD <sub>50</sub>	LD <sub>90</sub>	LD <sub>95</sub>	LD <sub>99</sub>	DD
Denlinger et al. (2016) ug/mL	<i>Ph. papatasi</i>	Deltamethrin					45,00
							25,00
							15,00
		Lambda-cyhalothin					5,00
							4,00
							2,00
Permethrin	60,00						
	50,00						
Karakus et al. (2016) (%)	<i>Phlebotominae</i> ( <i>Ph. tobbi.</i> <i>Ph. papatasi.</i> <i>Ph. perfiliewi.</i> <i>Ph. major.</i> <i>Se. dentata</i> )	Deltamethrin	0.01	0.027	0.184		0.368
		Permethrin	0.007	0.238	0.45		0.9

Note: DD: Diagnostic dose; LD: Lethal dose

Supplement 4. Lethal and diagnostics times of different insecticides for various species of sandflies tested in susceptibility bioassays.

Reference	Specie	Insecticide - Dose	LT <sub>50</sub> (min)	LT <sub>90</sub> (min)	LT <sub>95</sub> (min)	DT (min)
Mukhopadhyay et al. (1992)	<i>Ph. argentipes</i>	DDT - 4%	78	214		
Chandra et al. (1995)	<i>Ph. argentipes</i>	DDT - 4%	10,6			
		Dieldrin - 0,4%	10,2			
Fahmy et al. (1996)	<i>Ph. papatasi</i>	Malathion - 5%	2,8			
		Propoxur - 0,1%	8,4		29	
			3,4		25	
		Malathion - 5%	3,9		19	
			1,4		14	
		Deltamethin - 0,025%	1,65		10	
			1,7		14	
		Permethrin - 0,25%	3		13	
Singh and Bansal (1996)	<i>Ph. papatasi</i>	Propoxur - 0,1%	3		31	
			22		57,8	
		Malathion - 5%	19		55,3	
		Fenitrothion - 1%	22,3		43,7	
Maroli et al. (2002)	<i>Ph. perniciosus</i>	DDT - 4%	19,9		160,7	
		Lambda-cialotrin - 0,06%	3,2		62,4	
		Permethrin - 0,2%	6,9		126,5	
	<i>Ph. papatasi</i>	DDT - 2%	18		127,7	
		Lambda-cyhalothin - 0,06%	7,4		65,8	
		Permethrin - 0,2%	11		50,2	
		DDT - 2%	16,6		143,2	
<i>Ph. papatasi colony</i>	Lambda-cyhalothin - 0,06%	4,9		43,5		
	Permethrin - 0,2%	7,8		258,3		

Cont. Supplement 4. Lethal and diagnostics times of different insecticides for various species of sandflies tested in susceptibility bioassays.

Reference	Specie	Insecticide - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)	
Santamaria et al. (2003)	<i>Lu. longipalpis</i>	Lambda-cyhalothin - 10ug/mL	24		60		
			30				
		Fenitrothion - 40 uL/L	-				
			45				
			35				
			15				
		Malathion - 10uL/L	15				
			20				
			20				
			25				
Alexander et al. (2009)	<i>Lu. longipalpis</i>	Lambda-cyhalothin - 0,05%	15				
			45				
		Permethrin - 0,10%	25				
			60				
			25				
			60				
		Permethrin - 0,05%	30				
			40				
			25				
			25				

Cont. Supplement 4. Lethal and diagnostics times of different insecticides for various species of sandflies tested in susceptibility bioassays.

Reference	Specie	Insecticide - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Afshar et al. (2011)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT - 4%	16	40		
			20	55		
			26	97		
		Permethrin - 0,05%	10	29		
			13	41		
	<i>Ph. sergenti</i>	DDT - 4%	17	73		
			8	32		
			21	76		
		Permethrin - 0,05%	115	-		
			14	38		
Saeidi et al. (2012)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT - 4%	17	51		
			22	82		
			711,09	2025		
			1104,97	3531,45		
			1879,25	15418,4		
			973,51	8864,77		

Cont. Supplement 4. Lethal and diagnostics times of different insecticides for various species of sandflies tested in susceptibility bioassays.

Reference	Specie	Insecticide - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Saeidi et al. (2012)	<i>Ph. papatasi</i>	Cyfluthrin - 0,15%	10,05	147,39		
			15,42	202		
			20,94	315		
			0	54,75		
			2,65	117,56		
			11,07	8046,56		
			159,77	523,25		
		Permethrin - 0,75%	182,35	637,3		
			207,39	821		
			40,26	424		
			59,5	799,45		
			86,29	2299,1		
			19,37	238,7		
			26,79	315,03		
		Permethrin - 0,1%	34,79	447,2		
			0,66	42,54		
			4,4	80,29		
			9,32	329,63		
			0,71	35,62		
			1,48	44,8		
2,48	58,14					
Lambda-cyhalothin - 0,05%	0	9,2				
	1,5	30,3				
	6,03	231,37				

Cont. Supplement 4. Lethal and diagnostics times of different insecticides for various species of sandflies tested in susceptibility bioassays.

Reference	Specie	Insecticide - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)	
Saeidi et al. (2013)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT - 4%	1312,66				
			1200,97				
		Cyfluthrin - 0,15%	9,38				
			6,08				
		Permethrin - 0,75%	253,66				
			310,1				
		Permethrin - 0,1%	36,47				
			18,63				
Marceló et al. (2014)	<i>Lu. longipalpis</i>	Malathion - 50-150 ug/mL	0,1				
			0,1				
		Lambda-cyhalothin - 3,5-50 ug/mL	12		23	25	
			14		27	30	
Permethrin - 5-45 ug/mL	15		35	35			
Li et al. (2015)	<i>Ph. papatasi</i>	Chlorpyrifos - 0,01-0,00001%	53,1				
			28,3				
		Coumaphos - 0,01-0,00001%	-				
			77,6				
		Diazinon - 0,01-0,00001%	34,7				
			-				
		Dichlorvos - 0,01-0,00001%	53,4				
			25,5				
				-			
				122			
		58,4					
		-					

Cont. Supplement 4. Lethal and diagnostics times of different insecticides for various species of sandflies tested in susceptibility bioassays.

Reference	Specie	Insecticide - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Li et al. (2015)	<i>Ph. papatasi</i>	Cyfluthrin - 0,01-0,00001%	32,1			
			16,5			
		Cypermethrin - 0,01-0,00001%	-			
			30			
		Lambda-cyhalothin - 0,01-0,00001%	21,1			
			<20			
		Permethrin - 0,01-0,00001%	12,8			
			<10			
		Permethrin - 0,01-0,00001%	-			
			29,9			
		Permethrin - 0,01-0,00001%	<20			
			-			
		Pralethrin - 0,01-0,00001%	85,9			
			34,2			
		Carbaryl - 0,01-0,00001%	14,2			
			13,8			
Chlorpyrifos - 0,01-0,00001%	<10					
	-					
Malathion - 0,01-0,00001%	32,2					
	-					
Malathion - 0,01-0,00001%	26,8					
	21,4					
<i>Ph. duboscqi</i>	Chlorpyrifos - 0,01-0,00001%	<10				
	Chlorpyrifos - 0,01-0,00001%	<10				
Malathion - 0,01-0,00001%	-					
	13,1					



Cont. Supplement 4. Lethal and diagnostics times of different insecticides for various species of sandflies tested in susceptibility bioassays.

Reference	Specie	Insecticide - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)		
Li et al. (2015)	<i>Ph. duboscqi</i>	Cypermethrin - 0,01- 0,00001%	109,2					
			24,1					
			Etofenprox - 0,01- 0,00001%	<10				
				25				
			Lambda-cyhalothin - 0,01- 0,00001%	32,5				
				17,9				
				Permethrin - 0,01- 0,00001%	65,3			
					<20			
				Permethrin - 0,01- 0,00001%	<5			
					57,1			
		Prallethrin - 0,01- 0,00001%	20,2					
			<10					
			80,8					
			33,1					
			<20					
			22,4					
			<10					
			<5					

Cont. Supplement 4. Lethal and diagnostics times of different insecticides for various species of sandflies tested in susceptibility bioassays.

Reference	Specie	Insecticide - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Denlinger et al. (2016)	<i>Lu. longipalpis</i>	DDT - 2,5-700 ug/garrafa				30
		Bendiocarb - 1-8 ug/garrafa				40
						60
		Chlorpyrifos - 5-30 ug/garrafa				30
						45
		Fenitrothion - 2-32 ug/garrafa				45
						60
		Malathion - 5-45 ug/garrafa				60
		Propoxur - 1-10 ug/garrafa				30
						35
		Cypermethrin - 5-20 ug/garrafa				40
						60
		Lambda-cyhalothin - 1-40 ug/garrafa				40
						45
						60
		Permethrin - 5-100 ug/garrafa				35
						40
						60
		Permethrin - 5-20 ug/garrafa				30

Cont. Supplement 4. Lethal and diagnostics times of different insecticides for various species of sandflies tested in susceptibility bioassays.

Reference	Specie	Insecticide - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Denlinger et al. (2016)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT - 2,5-550 ug/garrafa				30
		Bendiocarb - 1-6 ug/garrafa				30
						40
		Chlorpyrifos - 20-45 ug/garrafa				60
		Fenitrothion - 4-45 ug/garrafa				60
		Malathion - 50-145 ug/garrafa				60
						30
		Propoxur - 1-15 ug/garrafa				35
						45
		Cypermethrin - 20-95 ug/garrafa				60
						40
		Lambda-cyhalothin - 1-40 ug/garrafa				60
						35
				40		
Permethrin - 5-100 ug/garrafa				45		
				60		
				40		
				60		
				40		
				60		

Cont. Supplement 4. Lethal and diagnostics times of different insecticides for various species of sandflies tested in susceptibility bioassays.

Reference	Specie	Insecticide - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)	
Azamani et al. (2017)	<i>Ph. sergenti</i>	DDT - 4%	12,80	39,63			
			15,37	51,09			
			18,33	73,14			
			16,47	39,63			
		Bendiocarb - 0,1%	19,15	47,4			
			40,62	60,98			
			4,47	14,15			
			Permethrin - 0,75%	6,31	18,56		
				8,13	27,71		
			Bidabadi et al. (2017)	<i>Ph. papatasi</i>	DDT - 4%	164,08	990,08
584,44	2631,11						
3819,86	30412256,7						
-	-						
Cyfluthrin - 0,15%	564,07	10602,31					
	-	-					
	0,41	106,84					
	1,53	281,05					
	3,34	1630,87					
	0,04	11,54					
0,6	25,34						
1,72	122,78						

Cont. Supplement 4. Lethal and diagnostics times of different insecticides for various species of sandflies tested in susceptibility bioassays.

Reference	Specie	Insecticide - Dose	TL <sub>50</sub> (min)	TL <sub>90</sub> (min)	TL <sub>95</sub> (min)	TD (min)
Bidabadi et al. (2017)	<i>Ph. papatasi</i>	Lambda-cyhalothin - 0,05%	0,1	195,81		
			16,91	928,8		
			51,04	-		
			1,88	246,19		
			9,78	804,27		
			19,82	25375,72		
			53,54	6754,81		
		110,1	44791,73			
		220,25	5094966,88			
		-	-			
		38,08	1462,91			
		-	-			
		3,32	98,64			
		11,64	274,31			
		26,79	2515,6			
Permethrin - 0,05%	0,25	151,83				
	1,95	440,87				
	5,41	3914,76				
	60,33	128,04	133			
	282,36	389	472,07			
Rama et al. (2017)	<i>Ph. argentipes</i>	DDT - 4%				

Note: min: minutes; DT: Diagnóctic time; LT - Lethal time

## 10. ANEXO II

Artigo II - A ser submetido. Revista não definida.

### **Feeding, but not sex, affect *Lutzomyia longipalpis* susceptibility to alpha-cypermethrin**

Douglas de Almeida Rocha<sup>a\*</sup>, Lidiane Medeiros da Costa<sup>b</sup>, Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa<sup>b</sup> and Marcos Takashi Obara<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Laboratory of Medical Parasitology and Vector Biology, University of Brasília, Darcy Ribeiro University Campus, Asa Norte, 70910-900, Federal District, Brasília.

<sup>b</sup> Hematophagous Insect Physiology Laboratory, Federal University of Minas Gerais, Pampulha Campus, 31970-201, Belo Horizonte, Minas Gerais.

\* Corresponding author at: Laboratory of Medical Parasitology and Vector Biology, University of Brasília, Darcy Ribeiro University Campus, Asa Norte, 70910-900, Federal District, Brasília. Tel.: +55 61 985900569; fax: +55 61 33710081.

E-mail addresses

Douglas de Almeida Rocha - dougalmeidarocha@gmail.com

Lidiane Medeiros da Costa - lidianem.dacosta@gmail.com

Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa – grasiellepessoa2016@gmail.com

Marcos Takashi Obara – marcos.obara@gmail.com

## **Abstract**

The aim of this study was to evaluate whether the variables sex and feeding have different impacts on insecticide susceptibility, and whether the mortality criterion adopted could interfere with insecticide susceptibility in sandflies. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) was submitted to susceptibility tests in which Centers for Disease Control and Prevention (CDC) bottle and the World Health Organization (WHO) cone test were used. The sandflies were exposed to the alpha-cypermethrin pyrethroid at concentrations of 3 µg/mL. Males, sugar-fed females, and blood-fed females were evaluated. Mortality curves were generated and analyzed using the JMP 10 program. Blood-fed females were more susceptible to alpha-cypermethrin when compared to sugar-fed females, when analyzed with the CDC bottle methodology. Males and females feeding sugar solution did not show significant difference. Using an adapted version of the WHO cone methodology, we found no differences in overall survival for the biological parameters feeding and sex. We also observed that when death criterion A (unable to fly or stand) was applied, sandflies were considered dead earlier than when applying criterion B for death. Our results show that feeding but not sex, affects insecticide susceptibility in female sandflies. We also found that the mortality criterion adopted affect results significantly.

**Keywords:** Phlebotominae, bioassays, insecticide resistance, insecticide susceptibility, Leishmaniasis

## Background

Leishmaniasis represents a set of parasitic infectious diseases produced by different species of flagellated protozoa of the genus *Leishmania*. These diseases, considered zoonoses, are present in 98 countries, distributed in the Americas, Europe, Africa, and Asia, of which 75 are endemic for visceral leishmaniasis (VL) and 87 for cutaneous leishmaniasis (CL). Currently, it is estimated that approximately 350 million people worldwide are exposed to these parasites (WHO Leishmaniasis 2019).

There is no effective and safe vaccine against leishmaniasis. Thus, prevention and control measures are based on: i) early diagnosis and treatment of cases in humans; (ii) serological surveys of canine populations and elimination of seropositive animals; (iii) environmental management to clean houses and surrounding areas of sandflies; and (iv) chemical control of vectors, particularly *Lutzomyia longipalpis* “sensu lato” (s.l.), for VL in Brazil (MS/SVS/DVE, 2017).

Chemical control can select individuals resistant to a particular insecticide. Insecticide resistance becomes a reality when insects are exposed to chemical compounds but remain alive. There are some methodologies for detecting insecticide resistance in sandflies, which were adapted from methodologies used for mosquitoes. These methodologies are the World Health Organization (WHO) impregnated paper kit and cone test (WHO, 1998; WHO, 2013) and trial Disease Control and Prevention Center (CDC) bottles (Brogdon & Chan, 2010). However, these methodologies do not specify the characteristics of the phlebotomine sample to be evaluated. Sex and feeding of sandflies, for example, may affect their susceptibility status. Females are responsible for stinging and transmitting *Leishmania*, and are usually used in trials (Falcão, 1963; Kaul *et al.*, 1978, Dhanda *et al.*, 1983; Dinesh *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2015), however there are studies that use males and females together (Dhiman *et al.*, 2003; Afshar *et al.*, 2011;



Denlinger *et al.*, 2016) and a single study that evaluated male sandflies only (Li *et al.*, 2015). This nonconformity in relation to sex is mainly because capturing a large number of sandflies of the same gender is difficult. Besides the nonconformity related to sample collection, there is the hypothesis that a given gender may be more susceptible to insecticide exposure than the other. Also, the type of diet fed to sandflies varies across studies. Some studies evaluate susceptibility of blood-fed females (Schmidt & Schmidt, 1969; Falcão *et al.*, 1988) while others evaluate only sugar-fed females (Denlinger *et al.*, 2016; Rama *et al.*, 2017). To date, there are no studies comparing blood- or sugar-fed female sandflies in laboratory conditions. This information is important to improve the susceptibility assay and thus detect resistant populations.

Guidelines for assessing vector insecticide resistance from the CDC and WHO (WHO, 1998; Brogdon & Chan, 2010) consider that insects that are inept to fly or cannot stand are dead. However, some authors believe that these criteria are subjective, which may lead to errors when establishing death rates. Thus, lack of any motion is also considered as a criterion for death in sandflies (Perea *et al.*, 2009; Marceló *et al.*, 2014; Denlinger *et al.*, 2015). Thus, the aims of this study were to evaluate whether the variables sex and feeding have different impacts on insecticide susceptibility. We also evaluated the different criteria used for death, as explained above, to see if they provide different results related to insecticide susceptibility in sandflies.

### **Material and methods**

Phlebotomines - *Lutzomyia longipalpis sensu lato* from Teresina (Piauí - Brazil) and raised at the Laboratory of Hematophagous Insect Physiology of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) were used in the study. This is a colony kept in insectarium since 2010, without input of external material and free of contact with insecticide.

Insectaries were maintained under controlled temperature ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $70 \pm 10\%$ ).

### **Biological Assays**

Biological assays were performed according to the Brogdon & Chan (2010) bottle methodology and also the WHO cone methodology, with modifications (2013). For the evaluation of sandflies with the adapted cone, 1 mm filter papers were impregnated with  $3\mu\text{g}/\text{m}^2$  alpha-cypermethrin insecticide and diluted in chloroform with the aid of a multichannel pipette. For 48 hours the papers were not exposed to the drying light. After impregnation, the papers were attached to a petri dish with the aid of adhesive tapes so that the cone was also attached in order for the insects to be exposed to the impregnated paper.

Male and female sandflies that fed sugary solution 30%, and females fed hamster (*Cricetus cricetus*) on the day before the tests were collected and added to bottles and cones. Ten insects per flask were tested for mortality evaluation. The exposure time started to count only after all insects were added to each vial. . In the control group, only acetone was used. At every 5 minutes, the flasks were evaluated by counting the number of sandflies still alive. Biological bioassays were repeated three times and the mortality reading was performed by a single researcher.

Two mortality criteria were adopted and evaluated in this study: criterion A - insects were considered dead if they were inept to fly or stand; criterion B - flies were considered dead if they did not show any motion.

### **Statistical analysis**

Lethal times of 50% (LT50) 90% (LT90) and 95% (LT95), i.e., the 50%, 90% and 95% death interval of the exposed insects of each population, respectively, were inferred

by analysis of Kaplan-Meier survival curves (KM) and compared by Log-rank test (Bustamante-Teixeira *et al.*, 2002). Estimates were calculated using the JMP 10 statistical program.

## Results

We observed a significant difference according to the feeding type of female sandflies when analyzed with the CDC bottle methodology (Fig. 1). Females fed blood meal were more susceptible to alpha-cypermethrin at a concentration of 3 µg/mL when compared to females fed sugar solution ( $p = 0.005$ ). When comparing males and females fed sugar solution ( $p = 0.501$ ) we did not observe significant difference. Using adapted WHO cone methodology, our results show no differences in overall survival for the type of feeding of sandflies ( $p = 0.223$ ) and sex ( $p = 0.598$ ) (Fig. 2).

According to criterion A, flies are considered dead if they are inept to fly or cannot stand (WHO, 1998; Brogdon & Chan, 2010) while other authors (Perea *et al.*, 2009; Denlinger *et al.*, 2015) consider that flies are dead if they do not show any motion (criterion B). When criterion A was adopted, (sandflies unable to fly or stand) sandflies were considered dead earlier than when criterion B was adopted (lack of motion) ( $p = 0.000$ ) (Table 1).

Figure 1. Blood-fed females (*Cricetus cricetus*) were more susceptible to alpha-cypermethrin at a concentration of 3 µg/mL using the CDC bottle methodology.

Kaplan-Meier Survival Curve Analysis in CDC Bottle Methodology: (a) blood-fed females died faster if compared to sugar-fed females ( $p = 0.005$ ); (b) the comparison between males and females fed sugar solution showed no significant difference ( $p = 0.501$ ).

Figure 2. Biological parameters using adapted WHO cone methodology showed no significant difference when exposed to 3 µg/mL alpha-cypermethrin.

Kaplan-Meier survival curve analysis using adapted WHO cone methodology: (a) there was no significant difference between females fed blood meal (*Cricetus cricetus*) and those fed a sugar solution ( $p = 0.223$ ); (b) the same occurred in the comparison between males and females fed sugar solution ( $p = 0.598$ ).

Table 1. Phlebotomine mortality occurred earlier by criterion A compared to criterion B. Mortality criteria A - flies are considered dead if they cannot fly or stand; Mortality criteria B - flies are considered dead if they do not show any motion.

## **Discussion**

In this study, we evaluated whether the variables sex and feeding have different impacts on insecticide susceptibility. We also evaluated the different criteria used for death to see if they provide different results related to insecticide susceptibility in sandflies. We found that feeding, but not sex, affects insecticide susceptibility in female sandflies. We also found that depending on the mortality criterion adopted results may differ significantly.

As shown in Figure 1, females that fed only blood were significantly more susceptible than those that fed only sugar ( $p = 0.005$ ). This result was probably due to the larger abdominal distension of females when they fed blood. Although sugary foods can fill more than half of the total volume of the abdomen of sandflies, differently than blood feeding it cannot completely distend it because they lack the nutrients needed for egg maturation (Schlein & Warburg, 1985). The distension exposes the abdominal intersegmental membranes, facilitating the penetration of the insecticide in the body

(Fontán & Zerba, 1987). Therefore, this result suggests that females that fed blood should not be used in assays testing insecticide susceptibility as it may overestimate the real effect of the insecticide. Thus, the capture of these blood-fed females should be avoided, which in general is an easy strategy to be adopted.

Kaplan Meier survival curves (Figures 1 and 2) showed no differences between male and female sandflies when tested using either bottle ( $p = 0.501$ ) or cone ( $p = 0.598$ ) methodologies. Some studies show that male insects are more susceptible to a particular insecticide (Alexandre *et al.*, 2009, Rama *et al.*, 2017) while exposure to other insecticides are more effective against females (Dinesh *et al.*, 2010; Saeidi *et al.*, 2012). Our results suggest that the susceptibility analysis of sandflies to insecticides can be performed using either sex, that is, without the need to separate sandflies by sex.

The cone methodology for sandfly susceptibility evaluation, commonly used in insecticide-impregnated walls, was adapted for the first time, as described in this study, for laboratory tests with sandflies. Our results show that this method is similar to that of impregnated bottles and paper kits and can also be used to evaluate insect resistance in the laboratory.

When lack of motion was adopted as the criterion for death (B), the experiments lasted longer than when adopting the other criterion (A) for death. Using criterion B, sandflies were exposed to LT95 for 230 minutes before they could be considered dead (Table 1). The same insects were evaluated for not being able to stand or fly (A) which in this case took about 42 minutes before they would be considered dead. Most studies that evaluated the susceptibility of sandfly populations to insecticide did not mention the mortality criteria applied. Our results recommend that only criterion A should be adopted in future studies of sandfly susceptibility. The adoption of criterion B would require a

very long time to evaluate insect resistance to insecticide and could mask the insect mortality data during the bioassay.

We suggest that the selection of sandflies to be tested in insecticide susceptibility studies should take feeding, and the mortality criteria to be applied, under consideration. The fact that we did not find any difference between females and males regarding insecticide susceptibility, may simplify sample collection in future studies. However, care should be taken when selecting sandflies, as the type of feeding may impact insecticide susceptibility. Lastly, the mortality criterion adopted is also relevant and our results indicate that criterion A should be adopted in future studies because it can quickly identify the susceptibility profile of sandflies to insecticides. For future analysis, the WHO cone methodology can be adapted to evaluate sandflies susceptibility to insecticide in the laboratory settings.

The limitations of this study were the significant drop in the number of sandflies of the *Lu. longipalpis* UFMG colony, which not allowed us to do continuous analysis and assays. Another factor was that the WHO impregnated paper kit was not used in all assays. Pilot tests were performed with the kit, however, phlebotomine scape from insecticide-treated tubes was seen, which may affect the number of sandflies in the experiment. We stop using the tube also due to laboratory biosafety issues.

In future studies, sandflies that suffered leg loss and are unable to fly after exposure to insecticide should be evaluated to confirm that they cannot perform vital activities such as feeding and reproduction. Our results show the need to standardize the parameters applied when performing biological assays for stablishing insecticide resistance to sandflies Because it will allow the comparison of results from different studies and consequently a better monitoring of sandflies populations over time, which will help us develop better programs to monitor sandfly populations.

## Conclusion

Herein we found that that feeding, but not sex, affects insecticide susceptibility in sandflies females. Because there is no difference between females and males regarding insecticide susceptibility, future studies can use a mix of the two in their sample analysis. We also found that the mortality criterion adopted affect results significantly. Thus, there is an urgent need to standardize the parameters applied when performing biological assays for stablishing insecticide resistance to sandflies.

## References

- Afshar, A.A., Rassi Y., Sharifi I. *et al.* (2011) Susceptibility Status of *Phlebotomus papatasi* and *P. sergenti* (Diptera: Psychodidae) to DDT and Deltamethrin in a Focus of Cutaneous Leishmaniasis after Earthquake Strike in Bam, Iran. *Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases*, **5**(2): 32-41.
- Alexander, B., Barros V.C., Souza, S.F. *et al.* (2009) Susceptibility to chemical insecticides of two Brazilian populations of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Tropical Medicine & International Health*, **14**(10): 1272-1277.
- Brogdon, W. & Chan, A. (2010) Guidelines for evaluating insecticide resistance in vectors using the CDC bottle bioassay. Centers for Disease Control and Prevention.
- Bustamante-Teixeira, M.T., Faerstein, E. & Latorre, M.R. Survival analysis techniques. *Caderno de Saúde Pública*, **18**: 579-594, 2002.
- Denlinger, D. S., Creswell J.A., Anderson J.L. *et al.* (2016) Diagnostic doses and times for *Phlebotomus papatasi* and *Lutzomyia longipalpis* sandflies (Diptera: Psychodidae:

Phlebotominae) using the CDC bottle bioassay to assess insecticide resistance. *Parasites and Vectors*, **9**: 212.

Denlinger, D. S., Lozano-Fuentes, S., Lawyer, PG. *et al.* (2015) Assessing Insecticide Susceptibility of Laboratory *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Journal of Medical Entomology*, **52**(5): 1003-1012.

Dhanda, V., Shetty, P.S., Dhiman, R.C. (1983) Studies on phlebotominae sandflies as vectors of kala-azar in Bihar. Proceedings of the Indo-UK Workshop on Leishmaniasis. *Indian Council of Medical Research*, 128–137.

Dhiman, R.C., Raghavendra K., Kumar V. *et al.* (2003) Susceptibility status of *Phlebotomus argentipes* to insecticides in districts Vaishahi and Patna (Bihar). *Journal Communicable Diseases*, **35**(1): 49-51.

Dinesh, D.S., Das, M., Picado, A. *et al.* (2010) Insecticide susceptibility of *Phlebotomus argentipes* in visceral leishmaniasis endemic districts in India and Nepal. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **4**(10): e859.

Falcão, A.R. (1963) DDT and dieldrin susceptibility of a natural population of *Phlebotomus longipalpis* in Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, **15**, 411-415.

Falcão, A.R., Pinto, C.T., & Gontijo, C.M. (1988) Susceptibility of *Lutzomyia longipalpis* to deltamethrin. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **83**(3): 395-396.

Fontán, A. & Zerba, E.N. (1987) Mode of entry insecticides in *Triatoma infestans*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **4**: 313 – 323.



Kaul, S.M., Wattal, B.L., Bhatnagar, V.N., Mathur, K.K. (1978) Preliminary observations on the susceptibility status of *Phlebotomus argentipes* and *P. papatasi* to DDT in two districts of North Bihar (India). *Journal Communicable Diseases*, **10**, 208-211.

Li, A.Y., Perez de Leon A.A., Linthicum K.J. *et al.* (2015) Baseline Susceptibility to Pyrethroid and Organophosphate Insecticides in Two Old World Sand Fly Species (Diptera: Psychodidae). *U.S. Army Medical Department Journal*, 3-9.

Marceló, C., Cabrera, O.L. Santamaria, E. (2014) Discriminating concentrations for three insecticides used in public health in a *Lutzomyia longipalpis* experimental strain from Colombia. *Biomedica*, **34**(4): 624-630.

MS/SVS/DVE - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância Epidemiológica (2017). *Manual da Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*, MS/SVS/DVE, Brasília, 180 pp.

Perea, E.Z., Balta Leon, R., Palomino Salcedo, M. *et al.* 2009 Adaptation and evaluation of the bottle assay for monitoring insecticide resistance in disease vector mosquitoes in the Peruvian Amazon. *Malaria Journal*, **8**: 208.

Rama, A., Kesari, S., Das, P. *et al.* (2017) Studying DDT Susceptibility at Discriminating Time Intervals Focusing on Maximum Limit of Exposure Time Survived by DDT Resistant *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae): an Investigative Report. *Japan Journal Infectious Diseases*, **70**(4): 437-441.

Schlein, Y. & Warburg A. (1985) Feeding behavior, midgut distension and ovarian development in *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Insect Physiology*, **31**(1): 47-51.

Schmidt, M.L. & Schmidt J.R. (1969) Insecticide susceptibilities of *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) from Egypt and the Sudan. *Journal of Medical Entomology* **6**(1): 87-90.

Singh, R. & Kumar, P. (2015) Susceptibility of the sandfly *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti (Diptera: Psychodidae) to insecticides in endemic areas of visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Japan Journal Infectious Diseases*, **68**(1): 33-37.

World Health Organization (1998). Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vectors, Bio-efficacy and Persistence of Insecticides on Treated Surfaces: Report of the WHO Informal Consultation. Document WHO/CDS/MAL/98.12. Geneva: WHO.

World Health Organization (2013). Guidelines for laboratory and field-testing of long-lasting insecticidal nets. WHO/HTM/NTD/WHOPES/20131.

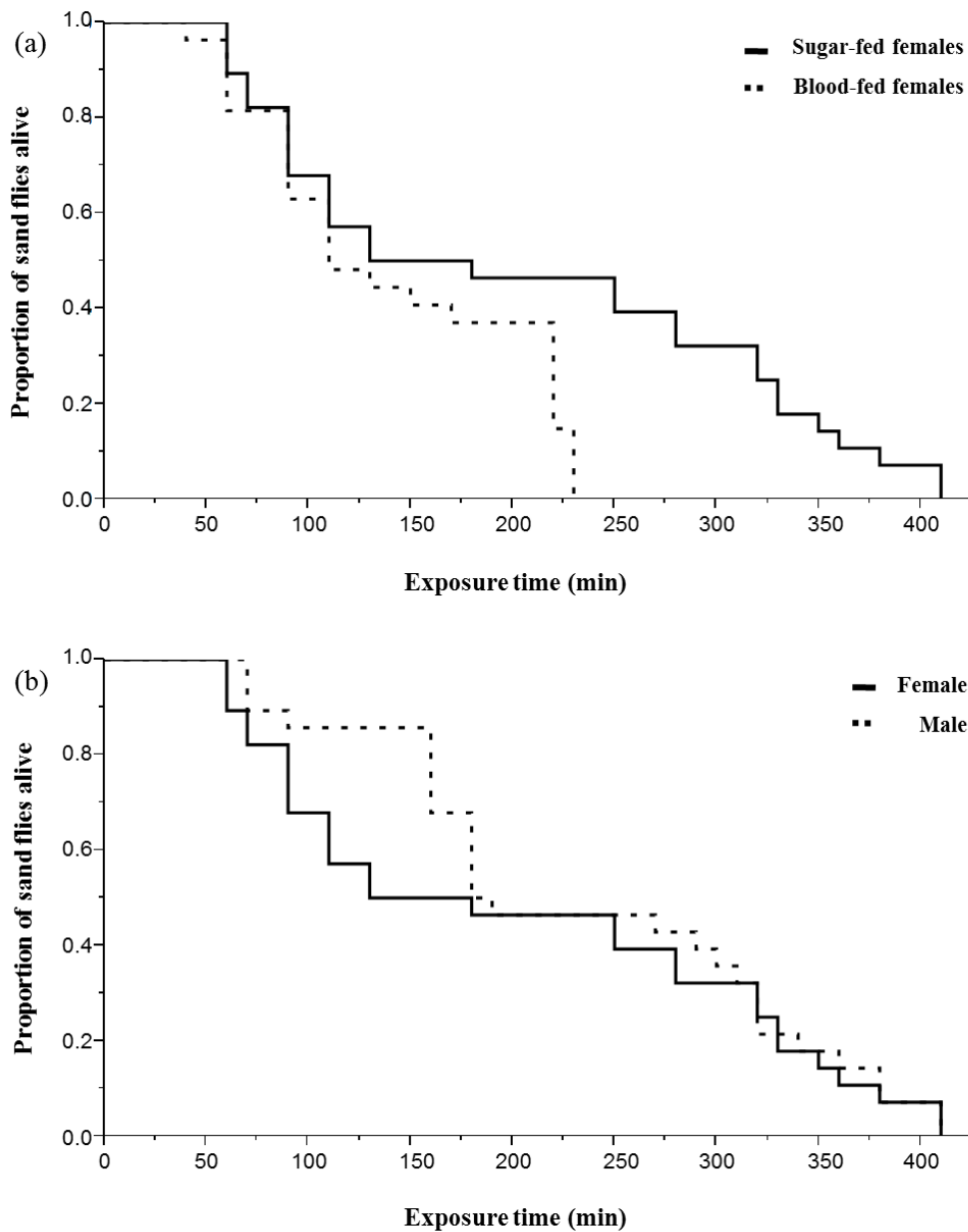
World Health Organization (2019). Leishmaniasis. Retrieved from <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> [Accessed on 01 October 2019].

Table 1. Phlebotomine mortality occurred earlier by criterion A compared to criterion B.

<b>Insect exposed</b>	<b>LT50</b>	<b>LT90</b>	<b>LT95</b>
<b>Criteria A</b>			
<b>Males</b>	26.36	33.59	35.42
<b>Females Sugar Fed</b>	22.33	30.39	32.51
<b>Females Blood Fed</b>	20.18	36.74	41.89
<b>Criteria B</b>			
<b>Males</b>	117.32	203.53	229.65
<b>Females Sugar Fed</b>	114.57	177.48	195.35
<b>Females Blood Fed</b>	96.56	163.41	183.38

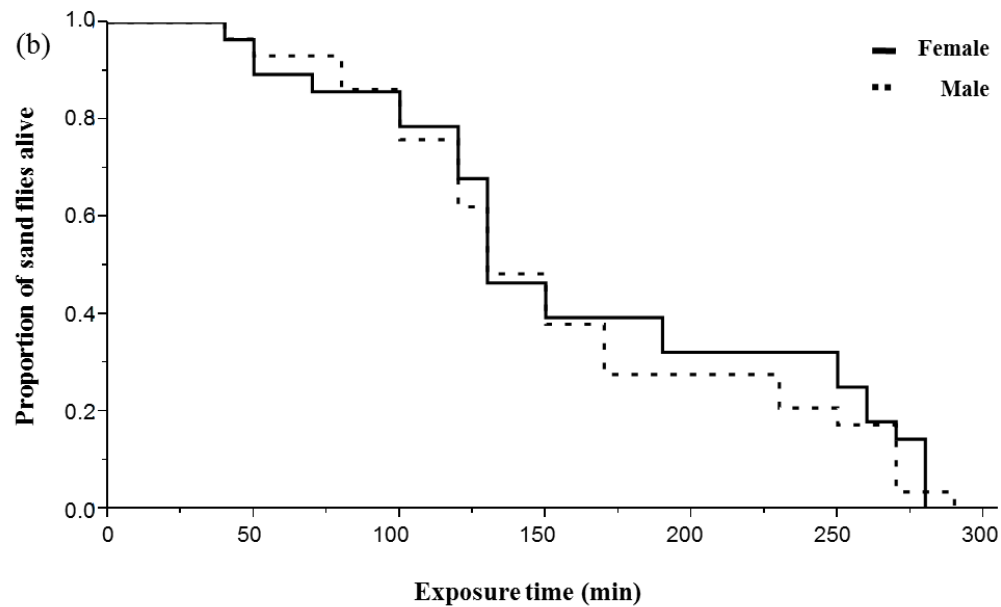
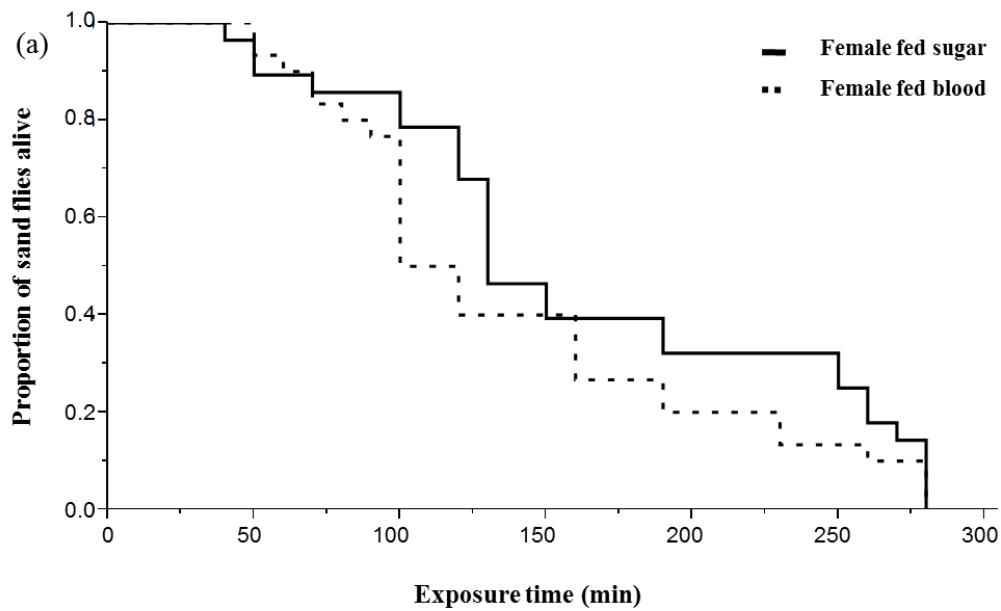
Mortality criteria A - flies are considered dead if they cannot fly or stand; Mortality criteria B - flies are considered dead if they do not show any motion.

Figure 1. Blood-fed females (*Cricetus cricetus*) were more susceptible to alpha-cypermethrin at a concentration of 3 µg/mL using the CDC bottle methodology.



Kaplan-Meier Survival Curve Analysis in CDC Bottle Methodology: (a) blood-fed females died faster if compared to sugar-fed females ( $p = 0.005$ ); (b) the comparison between males and females fed sugar solution showed no significant difference ( $p = 0.501$ ).

Figure 2. Biological parameters using adapted WHO cone methodology showed no significant difference when exposed to  $3 \mu\text{g/mL}$  alpha-cypermethrin.



Kaplan-Meier survival curve analysis using adapted WHO cone methodology: (a) there was no significant difference between females fed blood meal (*Cricetus cricetus*) and those fed a sugar solution ( $p = 0.223$ ); (b) the same occurred in the comparison between males and females fed sugar solution ( $p = 0.598$ ).

## 11. ANEXO III

Artigo III – A ser submetido. Revista ainda não definida.

### **Linhagem Referência de Suscetibilidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotominae) no Brasil**

Douglas de Almeida Rocha<sup>a\*</sup>, Lidiane Medeiros da Costa<sup>b</sup>, Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa<sup>b</sup> and Marcos Takashi Obara<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Laboratory of Medical Parasitology and Vector Biology, University of Brasília, Darcy Ribeiro University Campus, Asa Norte, 70910-900, Federal District, Brasília.

<sup>b</sup> Hematophagous Insect Physiology Laboratory, Federal University of Minas Gerais, Pampulha Campus, 31970-201, Belo Horizonte, Minas Gerais.

\* Corresponding author at: Laboratory of Medical Parasitology and Vector Biology, University of Brasília, Darcy Ribeiro University Campus, Asa Norte, 70910-900, Federal District, Brasília. Tel.: +55 61 985900569; fax: +55 61 33710081.

E-mail addresses

Douglas de Almeida Rocha - dougalmeidarocha@gmail.com

Lidiane Medeiros da Costa - lidianem.dacosta@gmail.com

Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa – grasiellepessoa2016@gmail.com

Marcos Takashi Obara – marcos.obara@gmail.com

## **Introdução**

As leishmanioses representam um conjunto de doenças infecciosas, consideradas zoonoses, podendo manifestar-se no ser humano quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do protozoário causador das doenças. Suas principais formas clínicas são a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT). A LV tem como principais sintomas a febre irregular, perda de peso, anemia e aumento do baço e fígado. Quando não tratada, leva a óbito em 90% dos casos. Além disso, há estimativas que acometa 90.000 pessoas a cada ano em todo o mundo. A LT é caracterizada por lesões na pele e mucosas, e embora óbitos sejam raros nessa forma da doença as cicatrizes deixadas causam graves estigmas sociais. Cerca de um milhão de casos ocorrem anualmente em todo mundo (OMS, 2019).

Devido à falta uma vacina segura e eficiente para combater as leishmanioses, assim como a baixa adesão ao tratamento e diversos efeitos colaterais causados pelos antimoniais pentavalentes, a eliminação do vetor é a melhor forma de interromper a transmissão humana, nas áreas endêmicas (Uribe-Restrepo et. al., 2018). Para reduzir a incidência da doença humana utiliza-se o controle químico, cujas aplicações ocorrem, desde a década de 40 (Kirk, 1958), muitas vezes sem o efeito desejado. Além disso, a sobreposição de endemias e o uso indiscriminado de inseticidas para controle de insetos vetores proporcionou o surgimento de populações de flebotomíneos resistentes (Mukhopadhyay et al., 1992).

Atualmente há registro de populações de flebotomíneos resistentes para as quatro classes de inseticidas (Dhanda et al., 1983; Bansal & Singh, 1996; Amauraj et al., 1999; Singh et al., 2015). No entanto, a definição de populações de flebotomíneos resistentes é baseada em conceitos e metodologias frequentemente utilizadas com mosquitos (WHO, 1998). Para definição de um protocolo próprio do grupo (Sardar et al. 2018) se faz

necessário a adoção de uma população de referência (Dinesh et al., 2010) e a delimitação de pontos de cortes específicos para flebotomíneos (Saeidi et al., 2012; Pessoa et al., 2015). Neste contexto, o objetivo deste estudo é avaliar duas possíveis populações de referência de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* para determinação de uma população de referência.

## **Material e métodos**

### **Flebotomíneos**

*Lutzomyia longipalpis* procedentes de Teresina (Piauí) e criados no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) foram utilizados no estudo. Trata-se de uma colônia mantida em insetário desde 2010, sem aporte de material externo.

*Lutzomyia longipalpis* procedentes de Jacobina (Bahia) e criados no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro foram (Fiocruz) utilizados no estudo. Trata-se de uma colônia mantida em insetário desde 1970, sem aporte de material externo.

*Lutzomyia longipalpis* capturados Montes Claros (Minas Gerais), área endêmica de leishmaniose visceral e com histórico de controle químico, também foram utilizados no estudo.

### **Bioensaios**

Os ensaios biológicos foram realizados conforme a metodologia de garrafas de Brogdon & Chan (2010) e uma metodologia adaptada de cones da OMS (1998). Garrafas do tipo Wheaton de 250 ml foram revestidas com 1 ml de acetona (controle) ou de inseticida (alfacipermetrina) na dosagem de 3µg/ml, sendo que os frascos foram girados



de modo que todo seu interior tenha sido impregnado pela solução. Após a impregnação, as garrafas foram abertas para evitar condensação e ficaram armazenadas em locais protegidos da luz, durante 24 horas.

Para avaliação dos flebotomíneos com cones, papéis vegetais foram impregnados com inseticida (alfacipermetrina) na dosagem de 3 $\mu$ g/mL, com auxílio de uma pipeta multicanal. Os papéis permaneceram por 24 horas sem contato com a luz para secagem. Após a impregnação, os papéis foram presos a uma placa de petri com auxílio de fitas adesivas, assim também foi preso o cone, de modo que os insetos ficassem expostos ao papel impregnado.

Flebotomíneos machos e fêmeas, em proporções iguais, introduzidos nas garrafas e cones com auxílio de um capturador de castro. Entre 10 e 20 flebotomíneos foram testados por metodologia para avaliação da mortalidade. A cada 10 minutos, as garrafas e os cones eram avaliados para contagem do número de flebotomíneos que permaneciam vivos. Os bioensaios biológicos foram repetidos cinco vezes e a leitura de mortalidade foi realizada por um único pesquisador. Os flebotomíneos foram considerados mortos quando não conseguiam se manter de pé e/ou apresentavam voos descoordenados.

### **Estatística**

Tempos letais de 50% (LT50) 90% (LT90) e 95% (LT95), ou seja, o intervalo de 50%, 90% e 95% de mortes dos insetos expostos de cada população, respectivamente, foram inferidos pela análise da curva de sobrevivência de Kaplan-Meier (KM) e comparadas pelo teste de Log-rank (Bustamante et al., 2002). As estimativas foram calculadas usando o programa estatístico JMP 10.

## Resultados

Nós observamos uma diferença significativa de acordo com as curvas de sobrevivência KM para as análises dos bioensaios de garrafas do CDC e de cones da OMS (Figura 1 e 2). Os flebotomíneos oriundos de Jacobina se mostraram mais suscetíveis do que os flebotomíneos de Teresina e Montes Claros no bioensaio de garrafa do CDC ( $p = 0.000$ ) e no bioensaio de cone da OMS ( $p = 0.006$ ) para alfacipermetrina na concentração de 3 ug/mL.

Os valores de LT50, LT90 e LT95 para as populações de Jacobina, Teresina e Montes Claros nos bioensaio de garrafas do CDC e de cones da OMS são apresentados na Tabela 1.

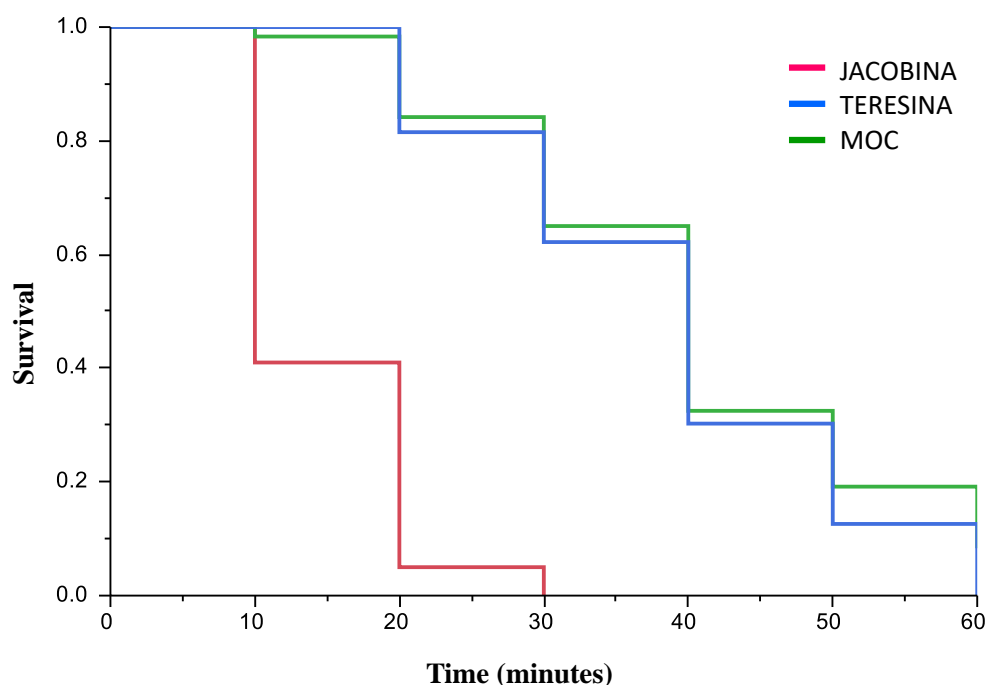


Figura 1. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier das populações de flebotomíneos de Jacobina, Teresina e Montes Claros com a metodologia de garrafas do CDC.

MOC – Montes Claros

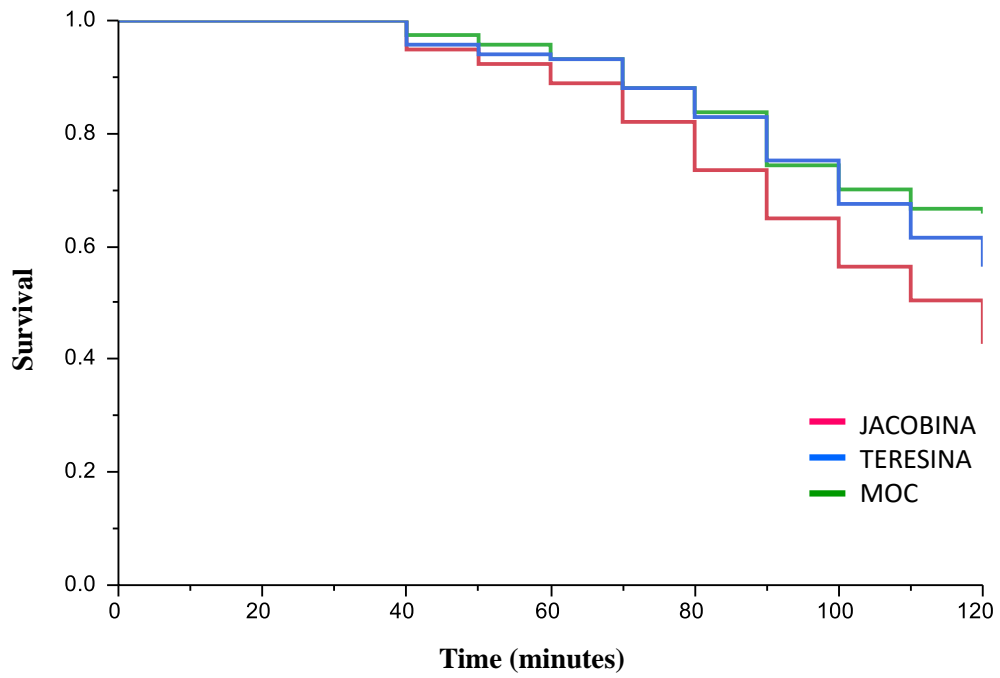


Figura 2. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier das populações de flebotomíneos de Jacobina, Teresina e Montes Claros com a metodologia de garrafas do CDC.

MOC – Montes Claros

Tabela1. Estimativas de LT50, LT90 e LT95 para as populações de flebotomíneos de Jacobina, Teresina e Montes Claros com a metodologia de garrafas do CDC e cones da OMS.

<b>Population</b>	<b>LT50 (IC 95%)</b>	<b>LT90 (IC 95%)</b>	<b>LT95 (IC 95%)</b>
<b>Bottle</b>			
<b>JACOBINA</b>	14.53 (13.15 - 15.67)	22.60 (20.93 - 24.40)	24.97 (23.01 - 27.09)
<b>TERESINA</b>	38.74 (36.42 - 41.21)	55.00 (52.05 - 58.12)	59.39 (55.96 - 63.03)
<b>MOC</b>	40.21 (37.52 - 43.09)	59.64 (55.75 - 63.80)	65.02 (60.40 - 70.01)
<b>Cone</b>			
<b>JACOBINA</b>	112.59 (104.37 - 121.46)	164.64 (147.12 - 184.24)	178.94 (157.68 - 203.05)
<b>TERESINA</b>	127.50 (116.42 - 139.64)	186.33 (160.08 - 216.97)	202.48 (170.87 - 239.95)
<b>MOC</b>	143.49 (125.62 - 163.91)	224.42 (178.67 - 281.88)	247.53 (192.19 - 318.81)

## Discussão

Neste estudo, avaliamos três populações de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, principal vetora de leishmaniose visceral no Novo Mundo, sendo duas de colônia e uma de campo, para definir uma população de referência para testes de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas. Os testes foram realizados por meio de duas metodologias diferentes: garrafas dos CDC e cones adaptados da OMS. Descobrimos que a população de *Lu. longipalpis* de Jacobina é a mais suscetível dentre as populações testadas.

A evidência de alta suscetibilidade de *Lu. longipalpis* de Jacobina pode resolver uma das grandes dificuldades em se desenvolver estudos de resistência a inseticidas que é a determinação de uma linhagem suscetível que possa ser utilizada como referência. Como preconizado da Organização Panamericana de Saúde (OPAS) (OPAS, 2005) entende-se por linhagem referência de suscetibilidade (LRS) aquela população que: i) apresentar pelo menos mais de cinco gerações criados sob condições de laboratório, sem contato com inseticidas; ii) não ter acréscimo de novos insetos na colônia durante as últimas cinco gerações e iii) o local de origem não pode ter tido contato com inseticidas. A partir da LRS, é possível classificar as populações do campo, em suscetível ou resistente, e essa informação é essencial para tomadas de decisão no controle desses vetores.

Pessoa et al., (2015) recomendaram como LRS a população de *Lu. longipalpis* oriunda da caverna da Lapinha (Lagoa Santa, Minas Gerais – Brasil). No estudo os autores encontraram alta suscetibilidade dessa população para o inseticida alfacipermetrina na metodologia de cones da OMS. No entanto, trata-se de uma população de flebotomíneos silvestre, na qual as colônias são rotineiramente

abastecidas devido os indivíduos estarem infectados com o protozoário *Ascogregarina chagasi*, conhecido por ocasionar significativa redução da longevidade de adultos (Wu & Tesh, 1989).

A partir da adoção de uma LRS, ferramentas essenciais para o monitoramento de populações de flebotomíneos de campo podem ser aprimoradas. Atualmente as concentrações de inseticidas utilizadas para detecção de resistência de flebotomíneos são as mesmas utilizadas para monitoramento de mosquitos (WHO, 1998). Com uma população de referência será possível determinar essas doses para flebotomíneos assim como delimitar pontos de corte para confirmação de resistência.

A dose diagnóstica, dose que mata 99% de uma população de referência, pode ser estabelecida para os principais inseticidas utilizados no controle de flebotomíneos no Brasil. A partir dela, o monitoramento de populações de campo será facilitado. A taxa de mortalidade de flebotomíneos de campo sobre a taxa de mortalidade da população de referência nos aponta a Razão de Resistência (RR). Para mosquitos foi estabelecido que uma  $RR > 3$  indica populações de campo resistentes (Brasil, 2006), enquanto que para triatomíneos este valor seria de  $RR > 5$  (Opas, 2005). Para flebotomíneos ainda não tem esse ponto de corte.

Como limitação do estudo, podemos apontar a avaliação apenas de duas populações de colônia brasileiras. De acordo com Lawyer et al. (2017) existem outras seis populações de *Lu. longipalpis* sendo criados no Brasil e talvez possam apresentar os requisitos da OPAS para LRS.

Deste modo, para um melhor monitoramento da suscetibilidade de populações de flebotomíneos de campo é essencial que haja a adoção de uma LRS e que

ferramentas como DD e pontos de cortes de RR sejam estimados. A população de *Lu. longipalpis* de Jacobina apresenta os requisitos para LRS e pode ser essa população.

## **Conclusões**

Nos resultados apontam a população de flebotomíneos de Jacobina e criados na Fiocruz do Rio de Janeiro como uma população que apresenta os requisitos solicitados pela OPAS para LRS. Recomendamos a utilização desta população para definição de doses e pontos de corte de resistência para melhorar o monitoramento da suscetibilidade de populações de flebotomíneos brasileiros.

## **Referências**

- Amalraj DD, Sivagnaname N, Srinivasan R. Susceptibility of *Phlebotomus argentipes* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae) to insecticides. J Commun Dis. 1999;31(3):177-80.
- Bansal SK, Singh KV. Susceptibility status of *Phlebotomus papatasi* and *Sergentomyia punjabaensis* (Diptera:Psychodidae) to some insecticides in district Bikaner (Rajasthan). J Commun Dis. 1996;28(1):28-32.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação geral do Programa Nacional do Controle de Dengue. Reunião Técnica para discutir o status de resistência de *Aedes aegypti* aos inseticidas. Brasília: Ministério da Saúde; 2006. p. 2.
- Brogdon W, Chan A. Guidelines for evaluating insecticide resistance in vectors using the CDC bottle bioassay. Centers for Disease Control and Prevention. Second edition. CDC Atlanta, USA: CDC technical report; 2010. p. 343.
- Bustamante-Teixeira MT, Faerstein E, Latorre, MR. Survival analysis techniques. Cad

Saude Publica. 2002;18:579-594.

Dhanda V, Shetty PS, Dhiman RC 1983. Studies on phlebotominae sandflies as vectors of kala-azar in Bihar. *Proceedings of the Indo-UK Workshop on Leishmaniasis. Indian Co Med Res* 128–137.

Dinesh DS, Das M, Picado A, Roy L, Rijal S, Singh SP. *et al.* Insecticide susceptibility of *Phlebotomus argentipes* in visceral leishmaniasis endemic districts in India and Nepal. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(10):e859.

Kirk R, Lewis DJ. The susceptibility of *Phlebotomus* species to DDT. *J Trop Med Hyg.* 1949;52(11):223-5.

Lawyer, P., Killick-Kendrick, M., Rowland, T., Rowton, E. & Volf, P. Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae). *Parasite* **24**, 42 (2017).

Mukhopadhyay AK, Saxena NBL, Narasimham MVVL, World Health Organization. Division of Control of Tropical D. Susceptibility status of *Phlebotomus argentipes* to DDT in some kala-azar-endemic districts of Bihar, India / by A. K. Mukhopadhyay, N. B. L. Saxena and M. V. V. L. Narasimham. 1992.

Organización Panamericana de la Salud (PAHO). II Reunion técnica latinoamericana de monitoreo de resistência a insecticidas em triatominos vectores de Chagas, OPS. Panamá: PAHO; 2005.

Pessoa GC, Lopes JV, Rocha MF, Pinheiro LC, Rosa AC, Michalsky EM, et al. Baseline susceptibility to alpha-cypermethrin in *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) from Lapinha Cave (Brazil). *Parasit Vectors.* 2015;8:469.

Saeidi Z, Vatandoost H, Akhavan AA, Yaghoobi-Ershadi MR, Rassi Y, Sheikh Z, et al. Baseline susceptibility of a wild strain of *Phlebotomus papatasi* (Diptera:



Psychodidae) to DDT and pyrethroids in an endemic focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Pest Manag Sci.* 2012;68(5):669-75.

Sardar AA, Saha P, Chatterjee M, Bera DK, Biswas P, Maji D, et al. Insecticide susceptibility status of *Phlebotomus argentipes* and polymorphisms in voltage-gated sodium channel (vgsc) gene in Kala-azar endemic areas of West Bengal, India. *Acta Trop.* 2018;185:285-93.

Singh R, Kumar P. Susceptibility of the sandfly *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti (Diptera: Psychodidae) to insecticides in endemic areas of visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Jpn J Infect Dis.* 2015;68(1):33-7.

Uribe-Restrepo A, Cossio A, Desai MM, Dávalos D, Castro M del M. Interventions to treat cutaneous leishmaniasis in children: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018; 12:e0006986

World Health Organization. Leishmaniasis. Consultation date: 01 October 2019. Available in: <https://www.who.int/leishmaniasis/en/>

World Health Organization. Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vectors, Bio-efficacy and Persistence of Insecticides on Treated Surfaces: Report of the WHO Informal Consultation. Document WHO/CDS/MAL/98.12. Geneva: WHO; 1998.

Wu, W.K.; TESH, R. B. Experimental infection of Old and New World phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) with *Ascogregarina chagasi* (Eugregarinorida: Lecudinidae). *Journal of Medical Entomology*, 26: 237-42,1989.