



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

**KAUARA BRITO CAMPOS**

**SUSCETIBILIDADE DE *Aedes aegypti* AOS INSETICIDAS PIRIPROXIFENO  
E MALATHION E COMPETÊNCIA DE INFECÇÃO POR ZIKA VÍRUS EM  
POPULAÇÕES RESISTENTES AO ANÁLOGO DE HORMÔNIO JUVENIL**

**Brasília**  
**2023**

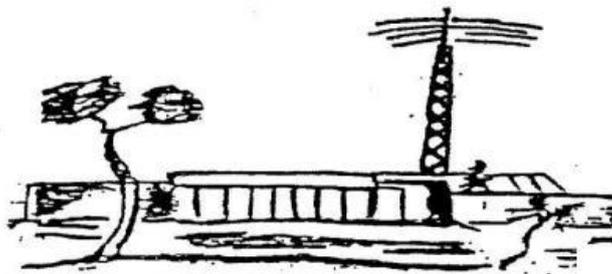
**SUSCETIBILIDADE DE *Aedes aegypti* AOS INSETICIDAS PIRIPROXIFENO  
E MALATHION E COMPETÊNCIA DE INFECÇÃO POR ZIKA VÍRUS EM  
POPULAÇÕES RESISTENTES AO ANÁLOGO DE HORMÔNIO JUVENIL**

**Kauara Brito Campos**

Tese 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

Coorientador: Prof. Dr. José Bento Pereira Lima



**Brasília**

**2023**

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

BC198s Brito Campos, Kauara  
Suscetibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas  
piriproxifeno e malathion e competência de infecção por Zika  
virus em populações resistentes ao análogo de hormônio juvenil  
/ Kauara Brito Campos; orientador Marcos Takashi Obara; co  
orientador José Bento Pereira Lima. -- Brasília, 2023.  
212 p.

Tese(Doutorado em Medicina Tropical) -- Universidade de  
Brasília, 2023.

1. *Aedes aegypti* . 2. Controle vetorial. 3.  
Arboviroses. 4. Resistência a inseticidas. 5.  
Piriproxifeno. I. Takashi Obara, Marcos , orient. II.  
Pereira Lima, José Bento , co-orient. III. Título.

**SUSCETIBILIDADE DE *Aedes aegypti* AOS INSETICIDAS PIRIPROXIFENO  
E MALATHION E COMPETÊNCIA DE INFECÇÃO POR ZIKA VÍRUS EM  
POPULAÇÕES RESISTENTES AO ANÁLOGO DE HORMÔNIO JUVENIL**

**Universidade de Brasília**

Banca Examinadora

Profa. Dra. Dinair Couto Lima

Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ

Profa. Dra. Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa

Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais –  
ICB/UFMG

Profa. Dra. Juliana Telles Deus

Seção Técnica de Doenças Veiculadas por Vetores e Hospedeiros  
Intermediários/Instituto Pasteur

Prof. Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves

Núcleo de Medicina Tropical/Universidade de Brasília

**Brasília**

**2023**

Trabalho dedicado aos Agentes de Controle de Endemias dos municípios brasileiros pelo trabalho árduo na execução de suas atividades.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me abençoar e permitir que tudo que desejo e pelo que luto aconteça em minha vida.

À minha família pela compreensão dos meus momentos de ausência e durante o Doutorado.

Aos professores Marcos Takashi Obara e José Bento Pereira Lima, pela orientação sempre com bastante tranquilidade e amizade, por acreditar no meu projeto e confiar no meu trabalho.

Ao professor Barry Alto, pelo convite para realizar parte das pesquisas na Universidade da Flórida, pelos ensinamentos e por me impulsionar a enfrentar desafios.

Aos professores do Núcleo de Medicina Tropical e da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UNB), pelos ensinamentos tão valiosos.

Aos professores do Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) José Bento, Ademir Martins e Nildimar Onório, e ao professor da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Álvaro Eiras, por contribuírem também com meu doutoramento aceitando minha participação em suas disciplinas e em discussões técnicas.

Às equipes do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores do Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz (LAFICAVE/ IOC/FIOCRUZ), Cynara Rodvalho, Diogo Bellinato, Luciana Dias e Rafi Rahman; e do Laboratório de Entomologia Aplicada de Superintendência de Controle de Endemias (LEnA/SUCEN), as irmãs Maria de Lourdes e Maria Teresa Macoris, pelas orientações e coautoria nos artigos, por todos os ensinamentos e disponibilidade para dividir sua tão vasta e valiosa experiência; e também às equipes que executaram ensaios em ambos os laboratórios.

Aos colegas do Laboratório de Entomologia Médica da Flórida, da Universidade da Flórida (FMEL/UF), Brad Eastmond, Abdullah Alomar, Kim Dongmin e Tanise Stenn, pelos ensinamentos, coautoria e apoio nos momentos mais difíceis do intercâmbio.

Aos trabalhadores dos Programas de Controle de Vetores e Laboratórios de Entomologia das Secretarias de Saúde dos estados e municípios, por

acreditarem nesse projeto e trabalharem tanto em prol do mesmo. Sem o empenho destas equipes nada aconteceria.

À Coordenação Geral de Vigilância das Arboviroses do Ministério da Saúde, por permitir minha dedicação exclusiva ao Doutorado.

Aos amigos que trabalham na Secretaria do Núcleo de Medicina Tropical da UNB e também aos amigos estudantes do Programa, pela amizade e incentivo sempre. Um abraço especial à Lúcia, que sempre demonstrou torcer bastante por mim.

Aos professores doutores Rafael Maciel de Freitas, Rodrigo Gurgel Gonçalves, Dinair Couto Lima, Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa e Julliana Telles Deus, membros das bancas de qualificação e de defesa de tese, por aceitarem o convite a fazerem parte deste trabalho me orientando na busca por melhoria.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Casos notificados e óbitos confirmados por dengue no Brasil entre 2013 e 2022. Pág. 2
- Figura 2.** Casos notificados de febre do chikungunya no Brasil e nas Américas entre 2013 e 2022. Pág. 6
- Figura 3.** Casos notificados de febre pelo vírus Zika no Brasil e nas Américas entre 2015 e 2022. Pág. 8
- Figura 4.** Inseticidas distribuídos pelo Ministério da Saúde do Brasil especificamente para o controle de *Aedes aegypti*, 1980 – 2019. Pág. 18
- Figura 5.** Mapa brasileiro mostrando os municípios participantes da rodada de monitoramento de 2017-2018 de suscetibilidade ao piriproxifeno e malathion em *Aedes aegypti*. Pág. 36
- Figura 6.** (a) Reunião com representantes estaduais dos Programas de Controle do *Aedes* e laboratórios de entomologia para apresentação do projeto. Vídeo instrucional padronizando a metodologia para coleta e envio de ovos de *Aedes aegypti*, contendo: (b) apresentação da armadilha de oviposição e forma de identificação, (c) orientação sobre locais de instalação da armadilha, (d) preenchimento do boletim de campo, (e) demonstração da armadilha instalada no peridomicílio e (f) forma de acondicionamento das paletas para envio ao laboratório. Pág. 38
- Figura 7.** Criação de mosquitos *Aedes aegypti* em laboratório. (a) Imersão das paletas para eclosão das larvas, (b) criação das larvas eclodidas em bacias, (c) alimentação de mosquitos adultos com solução de sacarose a 10%, (d, e, f) alimentação de fêmeas com sangue de coelho citratado através do alimentador de membranas Hemotek (Discovery Workshops, Accrington, Reino Unido), (g) manutenção dos mosquitos em gaiola até a cópula, (h) ovos da próxima geração da espécie *Aedes aegypti*. Pág. 41
- Figura 8.** Ensaios de avaliação da suscetibilidade de populações de *Aedes aegypti* ao PPF e ao malathion. (a, b) Preparo dos copos para exposição das larvas à DD do PPF ou ao controle com etanol, (c) garrafas impregnadas para exposição de fêmeas adultas à DD de malathion ou ao controle com acetona. Pág. 44
- Figura 9.** Mapa do Brasil mostrando as localizações geográficas onde mosquitos foram amostrados nos estados do Ceará e da Bahia, em 2020. Pág. 47

- Figura 10.** Criação de populações de mosquitos *Aedes aegypti* no Laboratório de Entomologia Médica da Flórida, e condução de bioensaios de resistência ao piriproxifeno. (a) criação de larvas de mosquitos em bacias, e manutenção de adultos em gaiolas plásticas; (a, b, c) condução de bioensaios de resistência dos mosquitos ao piriproxifeno, por meio da exposição de larvas a diferentes concentrações do produto em copos plásticos. Pág. 49
- Figura 11.** Mapa do Brasil mostrando as cidades onde populações de *Aedes aegypti* foram coletadas com seus níveis relativos de resistência ao PPF. Pág. 53
- Figura 12.** Preparo do sangue infectado para alimentação de fêmeas *Aedes aegypti*. (a) estoques da linhagem asiática de ZIKV, (b) alimentação sanguínea infecciosa preparada para infecção oral dos mosquitos (frasco T-175 à esquerda); sangue bovino desfibrinado (frasco à direita); frascos criogênicos contendo alíquotas de alimentação sanguínea coletadas imediatamente antes e após alimentação dos mosquitos. Pág. 54
- Figura 13.** Alimentação das fêmeas de *Aedes aegypti* com sangue bovino infectado. (a) fêmeas de *Ae. aegypti* mantidas em copos aguardando infecção oral, (b) alimentadores Hemotek preparados com membrana de intestino de ovelha, (c) inserção de sangue bovino infectado nos alimentadores Hemotek, (d, e) mosquitos sendo alimentados por meio de Hemotek em estufa a 28°C, (f) fêmeas ingurgitadas após alimentação, transferidas para novos copos com acesso a solução de sacarose a 10%. Pág. 56
- Figura 14.** Coleta de saliva de mosquitos *Aedes aegypti* por meio de papel catiônico à base de celulose. (a) papéis catiônicos [celulose-based cationic (Q) papers ou CQPs, sigla na língua Inglesa] úmidos tratados com mel e corante azul, colocados na tela da parte superior dos frascos de cultivo de *Drosophila*, (b) mosquito dentro do frasco se alimentando de mel no CQP, (c) visualização da coloração azul no abdômen de fêmea *Aedes aegypti* (a coloração aparentemente amarronzada do corpo do mosquito se deve à iluminação pela lanterna), (d) tubos de micro centrífuga e meio de cultura M199 para armazenamento das amostras (patas, corpos e papéis catiônicos) a -80 °C. Pág. 58
- Figura 15.** Mapa brasileiro exibindo os resultados da avaliação de resistência ao IGR piriproxifeno nas populações de *Aedes aegypti*, 2017-2018. Círculos verdes ou diamantes laranja representam localidades das quais as populações foram suscetíveis ou com resistência sugerida (IE <98%), respectivamente. Os estados da Bahia (BA) e Ceará (CE) e seus municípios com populações avaliadas foram destacados. Pág. 69

**Figura 16.** Determinação da dose diagnóstica (DD) de malathion em *Aedes aegypti*, cepa Rockefeller. (a) Mortalidade ao longo do tempo de exposição a garrafas impregnadas com diferentes doses. (b) Três ensaios independentes adicionais, apenas com DD ajustado para 20 µg/mL, mostrando 100% de mortalidade em 30 minutos. A seta vermelha destaca o tempo de 30 minutos. Pág. 71

**Figura 17.** Mapa brasileiro exibindo os resultados da avaliação de resistência ao organofosforado malathion em populações de *Aedes aegypti*, 2017-2018, empregando a dose diagnóstica de 20 µg/garrafa. Círculos verdes, diamantes laranja ou triângulos vermelhos representam localidades das quais as populações foram consideradas suscetíveis, com resistência sugerida ou com resistência confirmada, respectivamente. Pág. 75

**Figura 18.** Mapa brasileiro exibindo os resultados da avaliação de resistência ao organofosforado malathion em populações de *Aedes aegypti*, 2017-2018, empregando a dose diagnóstica de 50 µg/garrafa. Círculos verdes ou diamantes laranja representam localidades das quais as populações foram consideradas suscetíveis ou com resistência sugerida, respectivamente. Pág. 76

**Figura 19.** Inibição da emergência de adultos induzida por piriproxifeno para *Aedes aegypti* após a exposição a uma gama de doses. Doses são representados como transformação de  $\log_{10}$  em µg/L. As linhas representam o melhor ajuste para os dados. Os pontos representam uma inibição média de emergência de adultos de quatro réplicas biológicas. As barras de erro denotam o erro padrão. Pág. 79

**Figura 21.** Títulos de ZIKV em corpos (a), pernas (b) e saliva (c) em 14 dpi para indivíduos derivados de cinco populações brasileiras de *Aedes aegypti* com diferentes níveis de resistência a PPF e uma cepa de *Aedes aegypti* (Rockefeller) suscetível a inseticidas. As barras representam médias  $\pm$  erro padrão das médias. Círculos pretos e coloridos em (a) representam títulos virais para mosquitos com infecções não disseminadas (ou seja, infecção por ZIKV limitada ao intestino médio) e infecções disseminadas (infecção por ZIKV disseminada para a hemocele), respectivamente. Os símbolos de asterisco acima dos gráficos denotam diferenças significativas após comparações de títulos virais entre grupos infectados. Pág. 84

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Quantidade de piriproxifeno e malathion distribuídos pelo Ministério da Saúde do Brasil especificamente para o controle de *Aedes aegypti*, 2014 – 2019. Pág. 27
- Tabela 2.** Municípios participantes do monitoramento de suscetibilidade de populações de *Aedes aegypti* ao PPF e malathion, entre 2017 a 2018, no Brasil. Pág. 35
- Tabela 3.** Número de paletas, ovos e adultos de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* resultantes das coletas para avaliação de resistência, entre 2017 a 2018, no Brasil. Pág. 62
- Tabela 4.** Bioensaio tipo dose-resposta para determinar a dose diagnóstica de piriproxifeno para *Aedes aegypti*, cepa *Rockefeller*, 2017 – 2018. Pág. 64
- Tabela 5.** Distribuição dos percentuais de inibição da emergência de adultos (IE) de larvas de *Aedes aegypti* expostas ao larvicida PPF. Pág. 65
- Tabela 6.** Ensaio tipo dose-resposta com populações de *Aedes aegypti* resistentes ao PPF entre 2017 e 2018. Pág. 70
- Tabela 7.** Mortalidade de populações de *Aedes aegypti* ao malathion, entre 2017 e 2018. Pág. 73
- Tabela 8.** Amostragem das populações de campo do *Aedes aegypti* no Brasil, 2020. Pág. 77
- Tabela 9.** Bioensaios dose-resposta em *Aedes aegypti* resistentes ao PPF no Brasil, 2020. Pág. 78
- Tabela 10.** Regressão logística de populações de *Aedes aegypti* resistentes quanto à suscetibilidade à infecção (corpo). Pág. 82
- Tabela 11.** Regressão logística de populações de *Aedes aegypti* resistentes quanto à suscetibilidade à infecção disseminada (pernas). Pág. 82
- Tabela 12.** Regressão logística de populações de *Aedes aegypti* resistentes quanto à suscetibilidade à transmissão (saliva). Pág. 83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: Graus Celsius

µg/L: Micrograma por litro

µg: Micrograma

AchE: Acetilcolinesterase

ADEM: Encefalomielite disseminada aguda

AHJ: Análogo de hormônio juvenil

BA: Bahia

BPU: Benzo-fenil-ureia

*Bt: Bacillus thurigiensis*

CA: Carbamato

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CE: Ceará

CGVA/DEIDT/SVS/MS: Coordenação Geral de Vigilância das Arboviroses/  
Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis/Secretaria de Vigilância  
em Saúde/Ministério da Saúde

CHIKV: Vírus do chikungunya

Ct: Cycle Threshold (quantificação do DNA das amostras no qRT-PCR)

CL: Concentração Letal

CQP: sigla na língua Inglesa para cellulose-based cationic (Q) paper, em português papel catiônico à base de celulose

CSI: Inibidor de síntese de quitina

DCC: Dengue com complicações

DD: Dose diagnóstica

DDT: Dicloro-Difenil-Tricloroetano

DENV: Vírus do dengue

DL: Dose letal

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DP: Desvio padrão

ECSA: Leste/central/sul-africano

EI: Emergency Inhibition of adults

EST: Carboxilesterases

EW: *oil in water emulsion* ou, em português, emulsão de óleo em água

F1: Primeira geração

F2: Segunda geração

FHD: Febre Hemorrágica do Dengue

FiG: Figura

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

G: Grânulos

GABA: Ácido gama-aminobutírico

GBS: Síndrome de Guillain-Barré

GST: glutationa S-transfersase

IGR: Regulador de crescimento de insetos

IC: Intervalo de confiança

IE: Inibição de emergência de adultos

IGR: Inseticidas reguladores de crescimento

IOC: Instituto Oswaldo Cruz

LAFICAVE: Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores

LEnA: Laboratório de Entomologia Aplicada

MFO: Oxidase de Função Mista

MIV: Manejo integrado de vetores

MoReNAa: Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* aos Inseticidas;

MS: Ministério da Saúde

*Nav*: canal de sódio regulado por voltagem

NEO: Neonicotinoides

OC: Organoclorados

OMS: Organização Mundial da Saúde

OP: Organofosforados

PFUe/mL: Equivalente em Unidades Formadoras de Placa por mililitro

PI: Piretroides

PNCD: Programa Nacional de Controle da Dengue

PPF: Piriproxifeno

qRT-PCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real ou PCR quantitativo

RNA: Ácido ribonucleico

RR: Razão de resistência

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase

SCD: Síndrome do choque por Dengue

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SGB: Síndrome de Guillain Barré

SUCEN: Superintendência de Controle de Endemias

UBV: Ultra Baixo Volume

WHO: World Health Organization

WP: *wettable powder* ou, em português, pó molhável

ZIKV: Vírus do Zika

## **ÓRGÃOS FINANCIADORES**

Ministério da Saúde do Brasil (MS)

Laboratório de Entomologia Médica da Universidade da Flórida (FMEL/UF)

## ÍNDICE

Capítulo 1	INTRODUÇÃO	Pág. 1
1.1	Epidemiologia das arboviroses	Pág. 1
1.1.1	Dengue	Pág. 1
1.1.2	Chikungunya	Pág. 4
1.1.3	Febre do Zika	Pág. 7
1.2	Controle do mosquito <i>Ae. aegypti</i>	Pág. 11
1.2.1	Inseticidas utilizados em saúde pública para o controle do <i>Ae. aegypti</i>	Pág. 14
1.3	Resistência aos inseticidas	Pág. 19
1.3.1	Definição, tipos e mecanismos de resistência	Pág. 19
1.3.2	Histórico de resistência do mosquito <i>Ae. aegypti</i> aos inseticidas utilizados no seu controle, com ênfase para o Brasil	Pág. 23
Capítulo 2	JUSTIFICATIVA	Pág. 30
2.1	Perguntas de pesquisa	Pág. 31
Capítulo 3	OBJETIVOS	Pág. 32
3.1	Objetivo geral	Pág. 32
3.2	Objetivos específicos	Pág. 32
Capítulo 4	MÉTODOS	Pág. 33
4.1	Avaliação da suscetibilidade de populações de campo de <i>Ae. aegypti</i> ao PPF e malathion em 2017-2018	Pág. 33
4.1.1	Populações de estudo avaliadas em 2017 – 2018 e método de coleta de amostras	Pág. 33
4.1.2	Criação de mosquitos em laboratório	Pág. 40
4.1.3	Bioensaios de avaliação da resistência (2017 – 2018)	Pág. 42
4.1.3.1	Estimativa das doses diagnósticas	Pág. 42
4.1.3.2	Avaliação da suscetibilidade ao piriproxifeno (2017 – 2018)	Pág. 43

4.1.3.3	Avaliação da suscetibilidade ao malathion (2017 – 2018)	Pág. 45
4.1.4	Análise de dados (2017 – 2018)	Pág. 46
4.2	Avaliação da suscetibilidade de populações de campo de <i>Ae. aegypti</i> ao PPF em 2020	Pág. 46
4.2.1	Populações de estudo avaliadas em 2020 e método de coleta	Pág. 46
4.2.2	Criação de mosquitos em laboratório	Pág. 48
4.2.3	Preparação de piriproxifeno, bioensaios de toxicidade e estimativa da razão de resistência (2020)	Pág. 49
4.2.4	Análise de dados (2020)	Pág. 50
4.3	Suscetibilidade de populações de <i>Ae. aegypti</i> resistentes ao piriproxifeno à infecção pelo vírus Zika	Pág. 51
4.3.1	Aspectos éticos	Pág. 51
4.3.2	Populações de mosquitos	Pág. 52
4.3.3	Zika vírus e células	Pág. 53
4.3.4	Sangue infectado pelo vírus Zika e infecção oral	Pág. 54
4.3.5	Coleta de saliva por meio de papel catiônico (Q-paper)	Pág. 56
4.3.6	Extração de ácido ribonucleico e PCR em tempo real para quantificação do vírus Zika	Pág. 59
4.3.7	Análise estatística	Pág. 60
Capítulo 5	RESULTADOS	Pág. 61
5.1	Resultados dos ensaios de resistência aos inseticidas realizados em 2017 – 2018	Pág. 61
5.1.1	Planejamento e execução da avaliação de resistência de <i>Ae. aegypti</i> aos inseticidas utilizados no seu controle (2017-2018)	Pág. 61
5.1.2	Coleta de ovos de <i>Ae. aegypti</i> em campo (2017-2018)	Pág. 61
5.1.3	Suscetibilidade de populações de campo de <i>Ae. aegypti</i> ao piriproxifeno em 2017-2018	Pág. 64

5.1.4	Suscetibilidade de populações de campo de <i>Ae. aegypti</i> ao malathion em 2017-2018	Pág. 71
5.2	Resultados dos ensaios de resistência (2020)	Pág. 86
5.3	Resultados de suscetibilidade de populações de <i>Ae. aegypti</i> resistentes ao PPF à infecção e transmissão do vírus Zika	Pág. 80
Capítulo 6	DISCUSSÃO	Pág. 85
6.1	Discussão dos resultados da avaliação de resistência aos inseticidas realizada em 2017 – 2018	Pág. 85
5.2	Discussão dos resultados da avaliação de resistência aos inseticidas realizada em 2020	Pág. 76
5.3	Discussão dos resultados de suscetibilidade de populações de <i>Ae. aegypti</i> resistentes ao PPF à infecção e transmissão do vírus Zika	Pág. 86
Capítulo 6	DISCUSSÃO	Pág. 86
6.1	Discussão dos resultados da avaliação de resistência aos inseticidas realizada em 2017 – 2018	Pág. 86
6.2	Discussão dos resultados da avaliação de resistência aos inseticidas realizada em 2020	Pág. 87
6.3	Discussão dos resultados de suscetibilidade de populações de <i>Ae. aegypti</i> resistentes ao PPF à infecção e transmissão do vírus Zika	Pág. 91
Capítulo 7	CONCLUSÕES	Pág. 96
Capítulo 8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Pág. 97
Capítulo 9	ANEXOS	Pág. 113
Anexo I	Nota Informativa N° 103 de 2017/CGPNCMD DEVIT/SVS/MS. Informa nova proposta para as atividades de monitoramento da resistência de <i>Aedes aegypti</i> aos inseticidas utilizados pelo PNCD	Pág. 113
Anexo II	Metodologia para amostragem de <i>Aedes aegypti</i> por meio de armadilhas de postura (ovitrapas)	Pág. 121
Anexo III	Boletim de amostragem com ovitrapas no campo	Pág. 130

Anexo IV	Carta convite para realização de pesquisa no Laboratório de Entomologia Médica da Universidade da Flórida	Pág. 131
Anexo V	OFÍCIO N°. 37/2020/CGARB/DEIDT/SVS/MS – Apoio a pesquisa sobre resistência do <i>Aedes aegypti</i> a inseticida e competência vetorial	Pág. 132
Anexo VI	Licença para exportação de amostras	Pág. 135
Anexo VII	Documento de permissão para importação e transporte de vetores nos Estados Unidos	Pág. 137
Anexo VIII	Protocolo para replicação de células Vero, propagação e titulação viral (ensaio de placa)	Pág. 139
Anexo IX	Protocolo de extração de RNA e PCR (mosquito e vírus) em diluente BA-1 (QIAamp Viral RNA Mini Handbook)	Pág. 146
Anexo X	Artigo “Assessment of the susceptibility status of <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae) populations to pyriproxyfen and malathion in a national wide monitoring of insecticide resistance in Brazil, 2017-2018”, publicado na revista Parasites & Vectors	Pág. 153
Anexo XI	Artigo “Assessment of insecticide resistance of <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae) populations to the insect growth regulator pyriproxyfen, in the northeast region of Brazil”, publicado na revista Journal of Vector Ecology	Pág. 171
Anexo XII	Artigo “Brazilian Populations of <i>Aedes aegypti</i> resistant to pyriproxyfen exhibit lower susceptibility to infection with Zika virus”, publicado na revista Viruses	Pág. 178

## RESUMO

**Introdução:** No Brasil, o controle químico de *Aedes aegypti* continua sendo a principal ferramenta para prevenção de surtos de arboviroses. Monitorar a suscetibilidade do vetor aos inseticidas é importante para substituição das substâncias, caso haja resistência confirmada. Ainda, a relação entre mosquitos resistentes e a capacidade de infecção por arbovírus é pouco explorada e não está clara, principalmente por Zika vírus (ZIKV). **Objetivos:** Analisar a suscetibilidade de populações de *Ae. aegypti* aos inseticidas piriproxifeno (PPF) e malathion entre 2017 e 2018 no Brasil, assim como reavaliar a evolução da resistência ao PPF, após dois anos de exposição a aplicações bimestrais do larvicida, e investigar a relação entre mosquitos resistentes ao PPF e a capacidade de infecção por ZIKV. **Métodos:** Foram realizadas coletas de ovos de *Ae. aegypti* em 132 cidades por meio de armadilhas de oviposição. Colônias foram submetidas a testes de suscetibilidade com larvas expostas à Dose Diagnóstica (DD) de PPF (0,3 µg/L) e adultos com a DD de malathion obtida no laboratório (20 µg), além da DD indicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (50 µg) em ensaio com garrafa. Posteriormente, bioensaios Dose-Resposta (DR) com PPF foram realizados em populações com IE < 98% para estimar a RR. Em 2020, ovos foram coletados nas cidades onde registramos resistência ao PPF anteriormente, para novos bioensaios DR. Mosquitos de populações com diferentes níveis de resistência ao PPF e uma cepa suscetível a inseticidas (Rockefeller) foram experimentalmente infectadas oralmente com ZIKV para determinar sua competência vetorial relativa. **Resultados:** A alteração da suscetibilidade ao PPF foi registrada em 6 (4,5%) populações do vetor, nos estados Bahia e Ceará, com Razão de Resistência (RR) entre 1,51 a 3,58. Para malathion, 73 (55,3%) populações distribuídas no país foram resistentes quando expostas à DD local (20 µg/garrafa). Por outro lado, nenhuma população foi resistente e apenas 10 (7,6%) populações apresentaram suscetibilidade reduzida (taxa de mortalidade 90 a 98%) quando a DD da OMS (50 µg/garrafa) foi utilizada. Em 2020, mosquitos de Icó, Serrinha, e Brumado apresentaram baixos níveis de resistência ao PPF (RR<sub>50</sub>= 2,33, 4,52 e 4,83, respectivamente), níveis moderados foram detectados nas populações de Juazeiro do Norte

(RR<sub>50</sub>=5,83) e Itabuna (RR<sub>50</sub>=7,88), e alto nível em Quixadá (RR<sub>50</sub>=11). Embora todas as populações fossem competentes para infectar-se com ZIKV, aquelas com níveis moderados a altos de resistência a inseticidas (RI) exibiram suscetibilidade semelhante ou menor à infecção por ZIKV, comparando-se a populações de baixa RI ou à cepa suscetível. **Conclusões:** Registrou-se resistência ao PPF, em populações de *Ae. aegypti* procedentes do nordeste brasileiro, assim como a DD local para malathion (20µg/garrafa) foi mais sensível que a da OMS (50 µg/garrafa) para detectar precocemente diminuição da suscetibilidade; a evolução desta resistência pode comprometer os esforços para seu controle e o monitoramento contínuo é essencial no manejo efetivo de inseticidas. O uso do PPF para controle do *Ae. aegypti* pode estar associado ao benefício indireto de suscetibilidade reduzida à infecção por ZIKV, sem alterações na infecção disseminada e transmissão deste arbovirus entre fenótipos resistentes ao PPF.

**Palavras-chave:** Arbovírus, *Aedes aegypti*, resistência a inseticidas, inseticidas organofosforados, piriproxifeno, controle de mosquito, Zika vírus, infecção oral, competência vetorial.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Aedes aegypti* chemical control in Brazil remains the main tool for preventing arboviral outbreaks. Monitoring the vector's susceptibility to insecticides is essential for replacing substances in case of confirmed resistance. Still, the relationship between resistant mosquitoes and the ability to infect arboviruses is little explored and unclear, especially with the Zika virus (ZIKV).

**Objectives:** To analyze the susceptibility of *Ae. aegypti* populations to the insecticides pyriproxyfen (PPF) and malathion between 2017 and 2018 in Brazil, as well as to reassess the evolution of PPF resistance after two years of exposure to bimonthly applications of the larvicide; and to investigate the relationship between resistant mosquitoes to PPF and its ability to be infected by ZIKV.

**Methods:** *Ae. aegypti* eggs were collected in 132 cities using oviposition traps. Colonies were subjected to susceptibility tests with larvae exposed to the Diagnostic Dose (DD) of PPF (0.3 µg/L) and adults with the DD of malathion obtained in the laboratory (20 µg), in addition to the DD indicated by the World Health Organization (WHO) (50 µg) in bottle assay. Subsequently, Dose-Response (DR) bioassays with PPF were performed in populations with EI < 98% to estimate the RR. In 2020, eggs were collected in cities where we previously recorded PPF resistance for new DR bioassays. Mosquitoes from populations with different resistance levels to PPF and an insecticide-susceptible strain (Rockefeller) were experimentally orally infected with ZIKV to determine their relative vector competence. **Results:** Changes in susceptibility to PPF were recorded in 6 (4.5%) populations, in Bahia and Ceará states, with a Resistance Ratio (RR) from 1.51 to 3.58. For malathion, 73 (55.3%) populations distributed in the country were resistant when exposed to local DD (20 µg/bottle). On the other hand, no population was resistant, and only 10 (7.6%) populations showed reduced susceptibility (mortality rate 90 to 98%) when the WHO DD (50 µg/bottle) was used. In 2020, mosquitoes from Icó, Serrinha, and Brumado showed low levels of PPF resistance (RR<sub>50</sub>= 2.33, 4.52, and 4.83, respectively); moderate levels were detected in populations from Juazeiro do Norte (RR<sub>50</sub>=5.83) and Itabuna (RR<sub>50</sub>=7.88), and high level in Quixadá (RR<sub>50</sub>=11). Although all

populations were competent to become infected with ZIKV, those with moderate to high levels of insecticide resistance (IR) exhibited similar or lower susceptibility to ZIKV infection compared to populations with low IR or the strain susceptible.

**Conclusions:** Resistance to PPF was registered in *Ae. aegypti* populations from northeastern Brazil; as well as the local DD for malathion (20 µg/bottle) was more sensitive than the WHO one (50 µg/bottle) for early detection of decreased susceptibility; the evolution of this resistance can compromise efforts to control it, and continuous monitoring is essential for effective insecticide management. The use of PPF to control *Ae. aegypti* may be associated with the indirect benefit of reduced susceptibility to ZIKV infection without changes in disseminated infection and transmission of this arbovirus among PPF-resistant phenotypes.

**Keywords:** Arbovirus, *Aedes aegypti*, insecticide resistance, organophosphate insecticides, pyriproxyfen, mosquito control, Zika virus, oral infection, vector competence.

## 1. INTRODUÇÃO

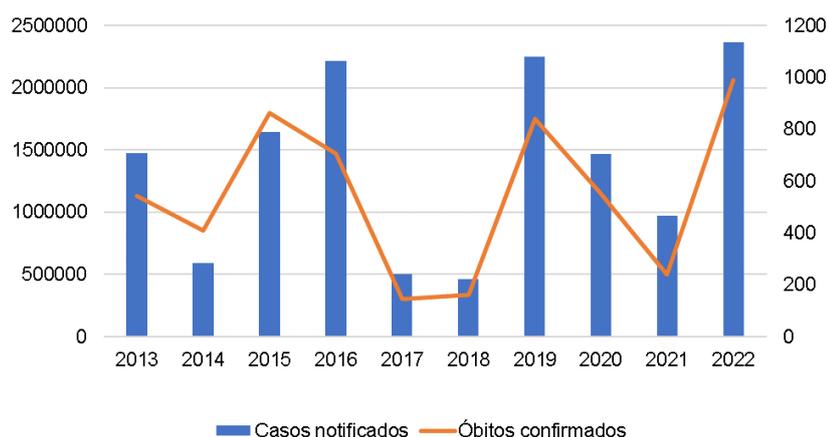
### 1.1. Epidemiologia das arboviroses

#### 1.1.1. Dengue

Dengue é uma doença causada por um arbovírus (vírus transmitido por artrópodes) do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, com 4 sorotipos distintos (DENV-1 a DENV-4). Estima-se que 3,9 bilhões de pessoas distribuídas em 128 países infestados por mosquitos do gênero *Aedes* estejam sob risco de infecção pela doença, principalmente em regiões tropicais e subtropicais da África, Américas, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental (Brady & Hay, 2020). Segundo Leta e colaboradores (2018), 111 (44,4%) países ou territórios relataram ocorrência autóctone de dengue entre 1952 e 2017.

O vírus dengue causa maior número de casos de doenças e mortes do que qualquer outro arbovírus que acomete humanos (Brady et al., 2012). Estima-se cerca de 400 milhões de infecções anuais de dengue no mundo, sendo cerca de 75% subclínicas. A Ásia responde por 75% da carga de doença, seguida pela América Latina e África (Bhatt et al., 2013). Mais de 20 milhões de casos de dengue foram notificados nas Américas, entre 2013 e 2022, dos quais 69,5% estavam concentrados no Brasil, o qual é responsável pelo registro de 56,7% das 9.188 mortes pela doença no continente sul-americano durante este período (OPS, 2023).

A Fig.1 apresenta os casos notificados e óbitos confirmados pela doença no Brasil entre 2013 e 2022.



**Figura 1.** Casos notificados e óbitos confirmados por dengue no Brasil entre 2013 e 2022. Fonte: PLISA Plataforma de Información em Salud para las Américas/Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2023).

A primeira epidemia brasileira de dengue documentada clínica e laboratorialmente aconteceu em 1981-1982, em Boa Vista/Roraima, causada pelos sorotipos 1 e 4. Em 1986, ocorreram epidemias no estado do Rio de Janeiro e em algumas capitais da região Nordeste. Desde então, a doença é considerada um relevante problema de saúde pública no país ocorrendo de forma endêmica, com epidemias geralmente associadas à circulação ou alteração dos sorotipos atualmente conhecidos ou com a circulação destes em áreas anteriormente indenes. Nos anos seguintes, a doença no país apresentou um processo de interiorização da transmissão com epidemias de grande magnitude, aumento do número de hospitalizações e óbitos e circulação simultânea dos quatro sorotipos (Brasil, 2019). O surgimento de novos sorotipos do vírus aumenta o risco de infecções novas e infecções mais graves, especialmente em áreas vulneráveis (Cunha et al., 2021; Ribeiro et al., 2021).

A maioria das infecções por dengue é assintomática, contudo, quando sintomática, a doença pode se desenvolver em sua forma leve (febre do dengue) ou formas mais graves da doença que podem levar ao óbito, incluindo a febre hemorrágica do dengue (FHD) ou síndrome do choque por dengue (SCD) (Dick et al., 2012). Os sintomas do dengue simples são inespecíficos: febre, artralgia, dores musculares, e no fundo dos olhos. Anorexia, náuseas, vômitos, diarreia e

exantema podem estar presentes. Os sinais de agravamento, que ocorrem com o declínio da febre, são dor abdominal intensa, vômitos persistentes, acúmulo de líquidos, hipotensão postural, letargia e/ou irritabilidade, hepatomegalia, sangramento de mucosa e aumento progressivo do hematócrito (Brasil, 2019).

No Brasil, adotou-se a classificação dengue com complicações (DCC), quando havia acometimento neurológico, hepático, renal ou outros sinais de agravamento, entretanto não havia resultado laboratorial positivo, sinais de extravasamento plasmático ou sangramento, impossibilitando a classificação do caso como FHD ou SCD. Buscando melhorar o registro dos casos graves, em 2009 a Organização Mundial da Saúde (OMS) adotou nova classificação dos casos de dengue (dengue sem sinais de alarme, dengue com sinais de alarme e dengue grave), já que com a classificação anterior os casos graves eram subnotificados. Essa nova forma de classificação dos casos foi adotada pelo Ministério da Saúde (MS)/Brasil em anos posteriores (Campos et al., 2015b).

No mosquito, o período de incubação extrínseco do vírus da dengue varia entre 8 e 12 dias (Gubler, 1997), enquanto que no homem o período de incubação intrínseco pode variar entre 3 e 14 dias (média de 4 a 7 dias). Nesse período, o vírus pode ser transmitido a outro mosquito durante o repasto sanguíneo, porém outros mecanismos de transmissão têm sido registrados, como por exemplo, por meio de transfusão de sangue, transmissão vertical, transplante de órgãos, lesões por picada de agulha e respingos de mucosa (Sabino et al., 2016; Arragain et al., 2017).

O principal vetor é o mosquito *Aedes aegypti*, do subgênero *Stegomyia* (Dick et al., 2012). A espécie *Ae. aegypti* também é responsável pela transmissão de outros arbovírus como chikungunya e Zika, podendo ocorrer circulação concomitante desses vírus em uma mesma região durante epidemias (Roiz et al., 2018). As doenças transmitidas por vetores exacerbam a pobreza, causam perda de dias de trabalho e escola, aumentam o custo dos cuidados de saúde e prejudicam a produtividade econômica (Parra-Henao et al., 2021).

A elevada taxa de adaptação da espécie *Ae. aegypti* e sua variação espaço-temporal favorecidas pelas mudanças climáticas foram demonstradas por Iwamura e colaboradores quando sugeriram que o mundo se tornou aproximadamente 1,5% mais adequado ao desenvolvimento desta espécie por

década, durante 1950-2000. Além disso, essa tendência deve acelerar para 3,2-4,4% por década até 2050 (Iwamura et al., 2020).

O mosquito *Aedes albopictus*, embora menos eficiente, é o principal vetor do dengue na Ásia. Apesar de presente no continente americano, até o momento não foi associado à transmissão dos vírus dengue, chikungunya e Zika nas Américas. Apesar disso, a importância da espécie *Ae. albopictus* não pode ser desconsiderada pelos programas de controle, uma vez que apresenta suscetibilidade para se infectar, propagar e/ou desenvolver e transmitir esses arbovírus sob condições de laboratório e está presente em todas as regiões do Brasil (Carvalho et al., 2014). Este vetor está se expandindo geograficamente para regiões de clima tropical e temperado, aumentando assim o potencial epidêmico do dengue em novas regiões temperadas (Rocklov et al., 2016).

### 1.1.2. Chikungunya

A doença Chikungunya é causada pelo vírus de mesmo nome (CHIKV), arbovírus pertencente ao gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*. CHIKV era mantido em ciclos silváticos nas regiões leste e central da África, entre mosquitos do gênero *Aedes*, pertencentes às espécies *Ae. furcifer*, *Ae. taylori*, *Ae. africanus* e *Ae. luteocephalus* e primatas não humanos nas florestas (Mason & Haddow, 1957; Diallo et al., 1999). Inicialmente, foi isolado de um paciente na Tanzânia durante um surto de doença semelhante ao dengue, em 1952 (Gudo et al., 2016). O nome dado ao vírus refere-se, no dialeto local, à postura curvada de pacientes afetados pelas dores nas articulações causadas pela doença (Halstead, 2015).

São sintomas de febre do chikungunya febre, erupção cutânea, dor articular, dor de cabeça, mialgia, conjuntivite, sintomas gastrointestinais como náusea, vômito, diarreia ou dor abdominal e fadiga, mal-estar ou fraqueza. Embora menos frequentes, podem ocorrer dor retro-orbital, distúrbios hemorrágicos e sintomas neurológicos. Muitos desses sintomas são comuns nas infecções por outras arboviroses como DENV e Zika vírus (ZIKV) (Ng et al., 2018), tornando o diagnóstico difícil quando há cocirculação desses vírus (Cabral-Castro et al., 2016). A infecção por CHIKV é altamente debilitante, entretanto causa baixas taxas de letalidade (Vairo et al., 2019).

Coinfecções de CHIKV e outros patógenos foram relatadas, sendo os mais comuns DENV, malária e ZIKV; além de triplas coinfeções simultâneas com CHIKV, DENV e ZIKV (Villamil-Gomez et al., 2016), que podem ser transmitidas pelos mesmos vetores, principalmente *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Tendinite, sinovite, distúrbios do equilíbrio, Síndrome de Guillain-Barré (SGB), artrite crônica, distúrbios neurológicos como encefalopatias, encefalomielite disseminada aguda e distúrbios oculares foram sequelas de longo prazo associadas à infecção por CHIKV (Mascarenhas et al., 2018).

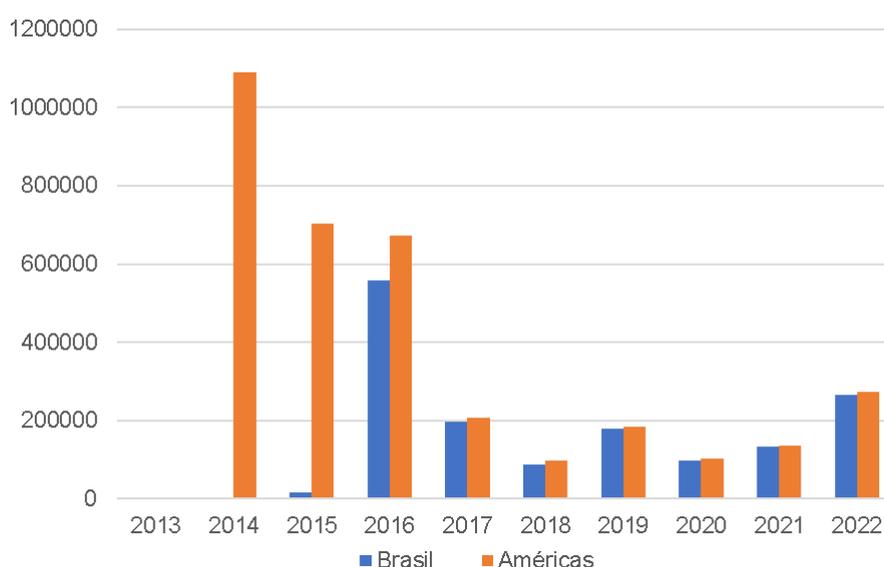
O período de incubação intrínseca varia entre 1 e 12 dias (média 2 a 7 dias), e o de viremia geralmente dura até o quarto ou sexto dia após início dos sintomas (Brouard et al., 2008). Foi relatada uma proporção de 3 a 28% de infecções assintomáticas durante epidemias (Ayu et al., 2010). A existência de condições crônicas preexistentes como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e obesidade, e faixa etária entre 55 e 64 anos foram fatores de risco para a maior incidência da doença (Mascarenhas et al., 2018). Já na faixa etária de 0 a 14 anos, a taxa de incidência foi mais baixa (Feldstein et al., 2016).

*Ae. albopictus* passou a ser espécie vetora altamente competente para CHIKV após a ocorrência de mutação na glicoproteína de membrana viral externa E1 detectada em linhagem proveniente de mosquito das Ilhas Reunião, causando alteração de aminoácidos com uma substituição de Alanina por Valina na posição 226 (Tsetsarkin et al., 2007). Após tal mutação, ocorreram grandes e frequentes epidemias, com emergência ou ressurgimento do CHIKV em diferentes continentes. As epidemias acometeram grande parte da população da Índia e ilhas do Oceano Índico, causaram alto número de casos graves nas Ilhas Reunião (34,3%), e taxas de letalidade de 4,5% nas Ilhas Maurício e 4,9% na Índia, em 2005 e 2006 (Renault et al., 2008). Outras epidemias ocorreram na Ásia e, em 2013, nas Américas, inicialmente nas ilhas St. Martin, na região do Caribe. Posteriormente a transmissão se expandiu para outras ilhas do Caribe e para a América do Sul, com altas prevalências e acometimento de regiões onde os vetores estavam bem estabelecidos (Mascarenhas et al., 2018). Como foi colocado anteriormente, a espécie *Ae. Albopictus* ainda não foi associada à transmissão dos vírus dengue, chikungunya e Zika nas Américas.

A urbanização e migração humana para áreas urbanas levaram à adaptação das espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* para viver próximo às

habitações humanas, sustentando o ciclo de transmissão entre mosquitos e humanos (Vairo et al., 2019). Outras formas de transmissão de CHIKV menos comuns que a picada de mosquitos infectados são as transfusões sanguíneas, picadas de agulha com sangue infectado e a transmissão vertical de mãe para filho, com ocorrência de complicações em neonatos de gestantes virêmicas (Torres et al., 2016). Foram relatadas transmissões por meio de enxertos de córnea, transfusões de rins e fígado (Couderc et al., 2012; Gasperina et al., 2015; Girão et al., 2017).

Assim como ocorrido na Índia, a epidemia iniciada em 2013 no Brasil foi associada a linhagens diferentes do vírus, asiática e ECSA (leste/central/sul-africana) (Conteville et al., 2016; Nyari et al., 2016). Desde 2015, mais de 100 países das Américas, Europa, Ásia e África notificaram casos de Chikungunya, e a doença afetou milhões de pessoas mostrando uma expansão alarmante das áreas sob risco de transmissão (Vairo et al., 2019). Entre os anos 2013 e 2022 foram notificados à Organização Pan Americana de Saúde 3.469.659 casos de infecção por CHIKV nas Américas. No Brasil, foram registrados 1.534.897 (44,2%) notificações, sendo o principal vetor a espécie *Ae. aegypti*. Os casos notificados de CHIKV podem ser observados na Fig. 2 (OPS, 2023).



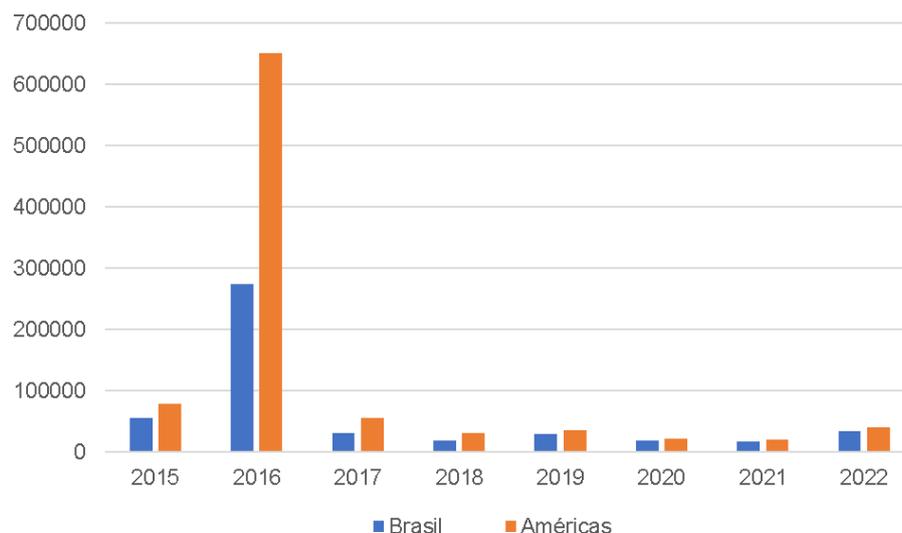
**Figura 2.** Casos notificados de febre do chikungunya no Brasil e nas Américas entre 2013 e 2022. Fonte: PLISA Plataforma de Información em Salud para las Américas/Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2023).

### 1.1.3. Febre do Zika

O vírus Zika (ZIKV), pertencente à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus* - agente causador da Febre do Zika é transmitido por fêmeas de mosquitos infectados do gênero *Aedes* (Hamel et al., 2015). Esse vírus foi isolado de um macaco do gênero *Rhesus*, na Floresta de Zika em Uganda em 1947, e de mosquitos na mesma floresta, no ano seguinte (Dick et al., 1952). A infecção em humanos foi descrita pela primeira vez na Nigéria (África), em 1953 (Macnamara, 1954). Nas décadas seguintes, ZIKV não foi considerado um problema de saúde pública devido a poucos casos clínicos relatados em humanos (Lessler et al., 2016), mesmo com evidências de anticorpos em populações de toda a África Subsaariana e Sudeste Asiático (Slavov et al., 2016).

O primeiro surto ocorreu em 2007, na Ilha Yap, Micronésia, causado pela linhagem asiática do vírus (Duffy et al., 2009). Aproximadamente 73% dos residentes da ilha foram infectados e relataram sintomas leves e de curta duração (Lessler et al., 2016). De 2013 a 2014, a Polinésia Francesa experimentou um surto de ZIKV com altas taxas de ataque e casos associados a complicações neurológicas (síndrome de Guillain-Barré) (Cao-Lormeau et al., 2016). O vírus se espalhou por todo o Pacífico Sul em 2014, provocando surtos na Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa (Roth et al., 2014).

Em 2015, foi relatado o primeiro surto nas Américas (Brasil) (Campos et al., 2015a; Zanluca et al., 2015) e, no ano seguinte, o vírus já circulava nas Américas do Sul, Central, do Norte e Caribe; enquanto um surto ocorria na África (Cabo Verde) (Musso & Gubler, 2016). Entre 2015 e 2022, foram notificados 938.688 casos de febre do Zika nas Américas, de acordo com a Organização Panamericana de Saúde, dentre os quais 51,3% ocorreram no Brasil, conforme demonstrado na Fig. 3 (OPS, 2023). Até o momento, um total de 89 países e territórios relataram evidências de infecção pelo vírus Zika transmitida por mosquitos, no entanto, a vigilância permanece limitada globalmente (WHO, 2023).



**Figura 3.** Casos notificados de febre pelo vírus Zika no Brasil e nas Américas entre 2015 e 2022. Fonte: PLISA Plataforma de Información em Salud para las Américas/Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2020).

ZIKV foi isolado em diversas espécies de mosquitos na África e Ásia, incluindo mosquitos arbóreos como *Aedes africanus* e outros de ampla distribuição tropical e subtropical como, respectivamente, *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (Marchette et al., 1969; Grard et al., 2014; Kazmi et al., 2020). Geralmente, é transmitido pela picada de mosquitos infectados, sendo *Ae. aegypti* a espécie considerada a mais importante vetora na transmissão para humanos (Marchette et al., 1969), e *Ae. albopictus* identificada como espécie vetora em potencial (Wong et al., 2013; Grard et al., 2014). Estes vírus são endêmicos, tendo se espalhado nos países infestados com mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (Musso & Gubler, 2016). Além da transmissão vetorial, há evidências de que ZIKV possa ser transmitido para humanos por exposição laboratorial, intrauterina, amamentação, sexual e transfusão de sangue, o que pode dificultar o controle desse vírus (Besnard et al., 2014; Slavov et al., 2016; Hills et al., 2017; Moreira et al., 2017).

A maioria das pessoas infectadas por ZIKV não desenvolvem sintomas. Quando se desenvolvem após período de incubação de cerca de 3 a 14 dias, os sintomas são leves e inespecíficos e podem incluir febre, erupção cutânea, conjuntivite, dores musculares e articulares, mal-estar, dor de cabeça e dor retro orbital, durando geralmente de 2 a 7 dias (Marano et al., 2016; WHO, 2023).

No Brasil, em novembro de 2014 estados da região Nordeste relataram surtos de infecção por ZIKV (Campos et al., 2015), e em maio do ano seguinte o primeiro caso autóctone de febre do Zika foi confirmado na Bahia (Zanluca et al., 2015; Musso & Gubler, 2016). Ao final do mesmo ano, o vírus já havia sido detectado em 19 dos 27 estados em todas as regiões do país (Brasil, 2017). No ano seguinte, o número estimado de casos prováveis (casos notificados, sendo excluídos os descartados) de febre pelo vírus Zika chegou a 215.319 (taxa de incidência de 105,3 casos/100 mil hab.), distribuídos em 2.306 municípios de todos os estados, tendo sido confirmados 130.701 (60,7%) casos (Brasil, 2017). Considerando a maior dificuldade para diagnóstico dos casos no início da epidemia, entretanto, estima-se que ocorreram entre 440.000 e 1.300.000 casos de ZIKV em 2015 (Heukelbach et al., 2016). Mais tarde, a transmissão autóctone do ZIKV se espalhou para todos os estados brasileiros, Américas do Sul e Central e para o Caribe (Fauci & Morens, 2016; Faria et al., 2017).

A associação entre infecção por ZIKV e sinais/sintomas neurológicos graves em adultos (Síndrome de Guillain-Barré) foi confirmada (Brito, 2015; ECDC, 2015), seguida pela confirmação da associação entre infecção por ZIKV e microcefalia neonatal, em outubro de 2015, no Brasil, após o isolamento do vírus do líquido amniótico e do tecido cerebral fetal (PAHO, 2015; Rasmussen et al., 2016; Schuler-Faccini et al., 2016). Análises retrospectivas sugeriram que nascimentos de bebês com microcefalia associados à infecção por ZIKV também ocorreram durante o surto na Polinésia Francesa, em 2013 e 2014 (Cauchemez et al, 2016).

No Brasil, entre 2015 e 2017, foram identificados no país 1.711 nascidos vivos com síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika, sendo a maioria dos casos confirmados nascida na região Nordeste (Brasil, 2022a). Infecção pelo ZIKV e outras arboviroses emergentes têm aumentado em incidência nas últimas décadas no mundo e sua circulação pode ocorrer concomitante na mesma região durante epidemias (Roiz et al., 2018).

Estudos filogenéticos sugerem que o ZIKV pode ter sido introduzido no Brasil durante o campeonato mundial de canoagem de primavera no Rio de Janeiro, em 2014, que contou com a participação de países do Pacífico em que o vírus circulava (Musso, 2015). Entretanto, discute-se que a cepa da Polinésia Francesa ZIKV, linhagem asiática do vírus, tenha entrado no país entre maio e

dezembro de 2013, durante eventos esportivos específicos (Faria et al., 2016). Como as primeiras epidemias foram relatadas na África e Ásia, ZIKV foi relacionado a duas linhagens Africanas (Leste e Oeste) e uma Asiática (Haddow et al., 2012), tendo sido a Asiática isolada durante a epidemia ocorrida em 2015 no Brasil (Faria et al., 2016) e circulado no país durante os anos seguintes. Em 2019, entretanto, foi detectada no Brasil a circulação de ZIKV da linhagem Africana em amostras de mosquitos *Ae. albopictus* provenientes do Rio Grande do Sul e de macacos da espécie *Alouatta guariba* (Almeida et al., 2020; Kasprzykowski et al., 2020). A circulação de diferente cepa representa um risco potencial para a ocorrência de novas epidemias.

## 1.2. Controle do mosquito *Aedes aegypti*

As vacinas são consideradas a principal forma de controlar surtos de doenças infecciosas (Excler et al., 2021). No entanto, considerando que poucas vacinas eficazes estão disponíveis para a maioria dos arbovírus, o controle vetorial continua sendo o método essencial para prevenção de infecções humanas e surtos de arboviroses (Domingo et al., 2008, Achee et al., 2015).

O mosquito africano *Ae. aegypti*, principal vetor das arboviroses, foi introduzido no Novo Mundo e geograficamente distribuído durante o tráfico de escravos entre a África Ocidental e as Américas e o comércio resultantes, durante os séculos XVII, XVIII e XIX. Esta espécie tornou-se altamente adaptada à vida em ambientes próximos aos seres humanos e espalhou-se pelos trópicos do mundo por meio de navios (Service, 1997). *Ae. aegypti* é um mosquito altamente doméstico que prefere depositar seus ovos em recipientes artificiais, comumente encontrados ao redor da casa. Recipientes usados para armazenamento de água são especialmente importantes na produção de um grande número de mosquitos adultos nas proximidades de moradias. Os mosquitos adultos preferem descansar dentro de casa, as fêmeas são discretas e preferem se alimentar em humanos durante o dia. São alimentadoras vorazes, interrompendo o processo de alimentação ao menor movimento para continuar a alimentação momentos depois, podendo se alimentar e transmitir vírus para várias pessoas em um curto período de tempo (Gubler & Rosen, 1976).

A migração rural-urbana, o crescimento da densidade populacional com ausência de fornecimento regular de água encanada, aumento da produção de lixo e, conseqüentemente, de criadouros para o vetor, tornam o ambiente urbano cada vez mais favorável à infestação do *Ae. aegypti*, vetor epidêmico bastante eficiente. Os ovos do vetor são capazes de resistir a longos períodos na ausência de água, existindo relatos de eclosão após 492 dias de seca (Silva & Silva, 1999). Isso contribui para sua manutenção no ambiente ao longo das diferentes estações climáticas e sua dispersão a novos territórios pelos meios de transporte, ampliando as áreas com possibilidade de transmissão dos arbovirus. Tais características de domiciliação, alimentação e dispersão do *Ae. aegypti*, assim como as condições climáticas favoráveis à sua reprodução, tornam seu

controle cada vez mais difícil e, conseqüentemente, das arboviroses causadas por arbovírus por ele transmitidos (Zara et al., 2016).

As ações para controle do *Ae. aegypti* coordenadas pelo Ministério da Saúde no Brasil se baseiam principalmente na mobilização social, no manejo ambiental e amparo de legislações buscando se manter ambientes livres de criadouros, além do uso de controle biológico e controle químico para redução da infestação (Brasil, 2009a). O manejo ambiental, que envolve o controle mecânico de criadouros buscando sua eliminação, cobertura, drenagem ou a criação de barreiras físicas como telas em janelas e portas são formas de controle capazes de produzir resultados mais duradouros (Manrique-Saide et al., 2015). Essas ações apresentam melhores resultados quando realizadas pelos agentes públicos com a participação da comunidade na identificação e eliminação dos criadouros, utilizando estratégias de educação em saúde e comunicação (Manjarres-Suarez & Olivero-Verbel, 2013). Com a compreensão da importância de manutenção do ambiente limpo, a eliminação ou destino adequado dos criadouros pode ser mantida nos períodos de ausência do poder público de maneira sustentável (Manjarres-Suarez & Olivero-Verbel, 2013).

O controle biológico consiste na utilização de predadores ou patógenos capazes de reduzir as larvas e pupas comendo-as, como no caso dos peixes, ou liberando toxinas como fazem algumas bactérias, fungos e parasitas. Bactérias entomopatogênicas bastante utilizadas para controle do *Ae. aegypti* são o *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), que produz endotoxinas de potente ação larvicida, e o *Bacillus sphaericus* (Boyce et al., 2013; Zara et al., 2016). Além destas, as espinosinas são moléculas extraídas da bactéria *Saccharopolyspora spinosa* que atuam como moduladores alostéricos, ou seja, alteram a conformação da proteína receptora de acetilcolina tornando-a mais ativa. O resultado é a ativação prolongada das proteínas receptoras de acetilcolina, causando a transmissão contínua e descontrolada dos impulsos nervosos e, conseqüentemente, hiperexcitação e tremores contínuos (McCormack, 2011).

A forma mais utilizada para controle do mosquito é o controle químico ou aplicação de inseticidas, por sua capacidade de reduzir rapidamente as populações de larvas e adultos interrompendo a transmissão de arbovírus (Valle et al., 2019). A redução da população do inseto na fase imatura (ovo, larva e

pupa) é mais factível, pois o ciclo de desenvolvimento desta fase do inseto ocorre em locais específicos e restritos, ao contrário dos indivíduos da fase adulta que podem ser encontrados dispersos em diversos ambientes. O controle químico das larvas é realizado por meio do tratamento focal, quando são aplicados inseticidas químicos ou biológicos nos depósitos de água descobertos e não passíveis de remoção. Para os mosquitos adultos o controle químico pode ser realizado por tratamento espacial perifocal ou a Ultra Baixo Volume (UBV). No tratamento perifocal, é aplicado inseticida de ação residual nas partes externas dos reservatórios e paredes próximas. É realizado em locais com grande quantidade de reservatórios e locais recém infestados. Já o tratamento a UBV consiste na aspersão aérea de inseticida buscando a rápida redução da população do vetor alado, sendo utilizado para bloqueio de transmissão das arboviroses e controle de surtos ou epidemias (Brasil, 2009; Manjarres-Suarez & Olivero-Verbel, 2013; Zara et al., 2016).

O controle químico deve ser utilizado de maneira complementar ao manejo ambiental, uma vez que sem a mobilização da população e sem ações de saneamento não se consegue a manutenção de um ambiente com baixa quantidade ou livre de criadouros. O uso racional da combinação dos diferentes métodos de controle de maneira mais custo-efetiva, sustentável, segura e ecológica para a redução da população vetorial é chamado Manejo Integrado de Vetores (MIV), considerado vital para o alcance dos objetivos de controle das doenças de transmissão vetorial (WHO, 2012). MIV inclui o envolvimento regular da comunidade, vigilância de vetores e patógenos, mapeamento e redução de criadouros, controles biológico e químico, monitoramento da eficácia e resistência dos mosquitos vetores a inseticidas.

O Ministério da Saúde do Brasil recomenda a aplicação de larvicidas, a cada dois meses, em reservatórios domésticos que não podem ser cobertos ou eliminados. Além disso, ciclos de aplicações espaciais de inseticidas são recomendados sempre que houver transmissão de arbovírus em uma determinada localidade (Brasil, 2020). Assim, as ações de saúde pública para controlar o vetor no país consomem uma quantidade expressiva de inseticidas anualmente, considerando que 5.237 municípios brasileiros registraram casos de dengue nos anos de 2017 a 2021, de acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Ministério da Saúde (SINAN/MS) (Brasil, 2023).

### **1.2.1. Inseticidas utilizados em saúde pública para o controle de *Ae. aegypti***

Os controles químico e biológico do mosquito *Ae. aegypti* no Brasil são realizados somente com a utilização de inseticidas pré-qualificados pela OMS para uso em água destinada ao consumo humano ou para aplicação no meio ambiente, fornecidos pelo Ministério da Saúde às Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde. No processo de pré-qualificação, os produtos passam por avaliações confiáveis de segurança, toxicidade ambiental e eficácia (Lima et al., 2011). Seu uso deve respeitar as recomendações de formas de aplicação e dosagens recomendadas pela OMS para minimizar os riscos à saúde da população humana e animal e desequilíbrios ao meio ambiente, já que outras populações podem ser afetadas e não apenas a de mosquitos. Além disso, o Ministério da Saúde avalia os compostos sob condições locais antes de sua aquisição para utilização pelos Programas Municipais de Controle de Vetores (Lima et al., 2011).

Estes inseticidas químicos pertencem às classes dos organoclorados (OC), organofosforados (OP), carbamatos (CA), piretróides (PI) e, mais recentemente pré-qualificados, inseticidas reguladores de crescimento (IGR), neonicotinóides (NEO) e butenolides (WHO, 2023a). Os OC agem na transmissão dos impulsos nervosos pela modificação da entrada e saída de íons da membrana dos neurônios, atuando sobre o canal de sódio regulado por voltagem ( $Na_v$ ) ou sobre o receptor do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA), pós-sináptico. O efeito final desses inseticidas neurotóxicos é a hiperativação dos neurônios e músculos, ocasionando fadiga, paralisia e morte (Valle et al., 2015). Foram utilizados mundialmente, entre 1940 e meados dos anos 1960, quando foram trocados por outros inseticidas de menor toxicidade, persistência no ambiente e bioacumulação na cadeia alimentar, apesar de sua alta eficiência no controle vetorial (Fatta et al., 2007; Roberts et al., 2015). Do grupo dos organoclorados, o Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT) está entre os inseticidas pré-qualificados com restrições, de uso proibido no Brasil, mas ainda utilizado em alguns países principalmente para o controle da malária (WHO, 2023a).

OP são derivados do ácido fosfórico e seus homólogos, e têm como mecanismo de ação a inibição da enzima colinesterase. São mais tóxicos para os invertebrados que os demais inseticidas, entretanto são quimicamente instáveis, tendo sido substituído pelos organoclorados por não se bioacumularem no organismo, tecidos ou ambiente, apresentando baixa toxicidade aos vertebrados e baixo custo (Mídio & Silva, 1995; Roberts et al., 2015). Entre os OP pré-qualificados estão o fenitrothion, malathion, chlorpyrifos, fenthion, pirimiphos-methyl e temefós (WHO, 2023a).

CA são derivados do ácido carbâmico de ação praguicida altamente eficiente, inibidores da acetilcolinesterase como os organofosforados. Possuem baixa ação residual devido à instabilidade química de suas moléculas, e baixa toxicidade a longo prazo se comparados aos organofosforados (Mídio & Silva, 1995). São CA pré-qualificados para controle do *Ae. aegypti* os inseticidas bendiocarb e propoxur (WHO, 2023a).

Os PI, desenvolvidos na década de 80, atuam na modulação dos canais de sódio e são considerados seguros devido a sua alta propriedade inseticida em baixas doses de aplicação, persistência no meio ambiente e toxicidade em mamíferos (Marcombe et al., 2009a). Dessa classe, alpha-cypermethin, bifenthrin, cyfluthrin, deltamethrin, etofenprox, lambda-cyhalothrin, permethrin e cyphenothrin possuem pré-qualificação (WHO, 2023a).

Entre os IGR estão as benzoylureas e os análogos de hormônio juvenil. Os IGR em insetos se destacam por serem seletivos contra espécies específicas, trazendo segurança ao meio ambiente (Mulla et al., 2003). As benzoylureas possuem como modo de ação a inibição da síntese de quitina, elemento essencial do exoesqueleto para proteção mecânica do inseto. Dessa maneira, impedem o desenvolvimento das larvas ou levam à má formação e esterilidade em insetos adultos, caso consigam eclodir (Muthukrishnan et al., 2012). Os análogos de hormônio juvenil, inseticidas de uso recomendado em água para consumo humano, agem prolongando o estágio imaturo por até 20 dias e inibindo o desenvolvimento de características de inseto adulto. A metamorfose completa é, portanto, comprometida com a mortalidade, especialmente no estágio pupal ou com o surgimento de adultos malformados. Diflubenzuron e novaluron são as benzoylureas, e piriproxifeno (PPF) o análogo de hormônio juvenil pré-

qualificados pela OMS para uso em água de consumo humano (Koehler & Patterson, 1991; Valle et al., 2015; WHO, 2023a).

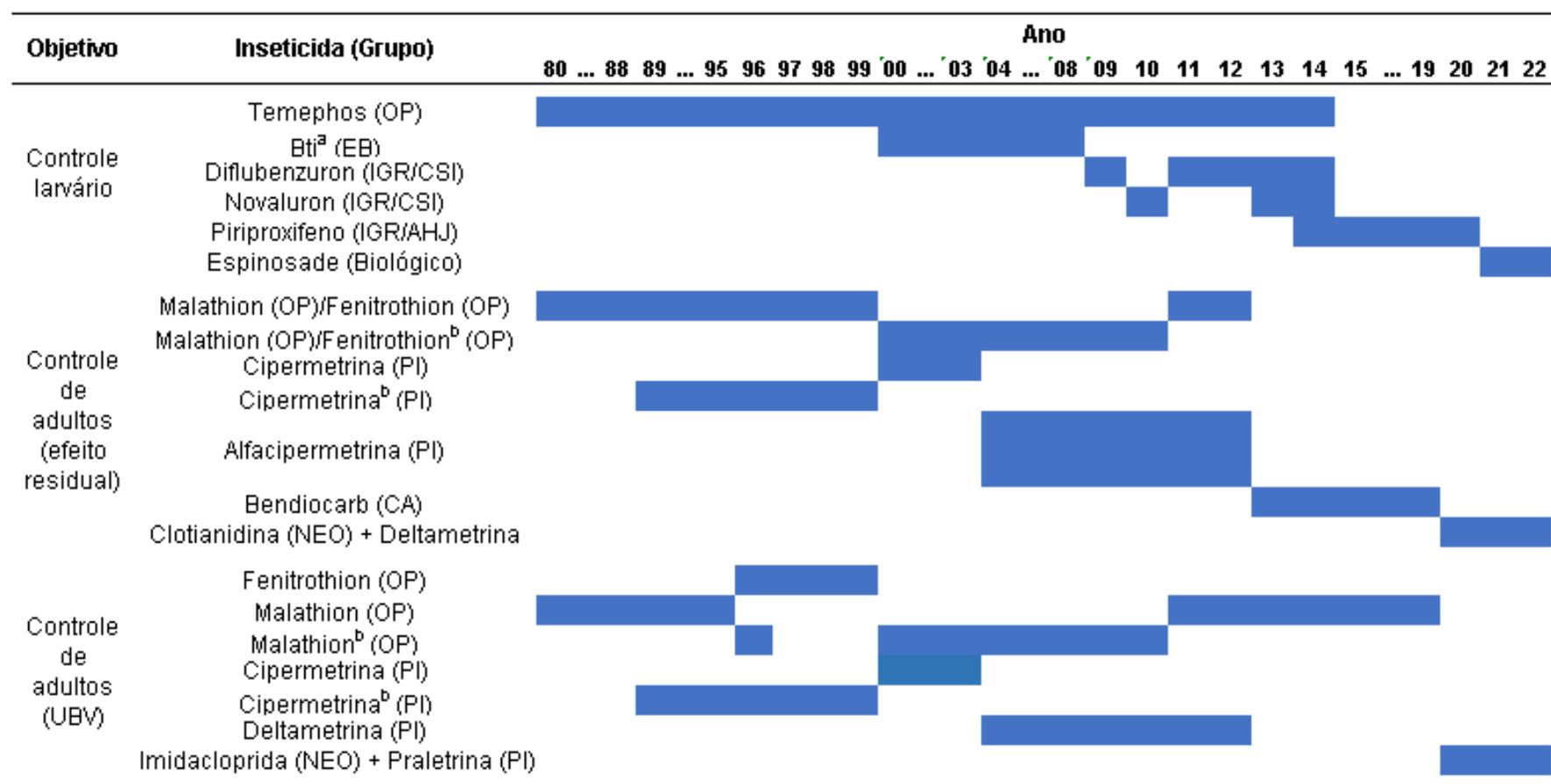
Os inseticidas do grupo NEO agem como agonistas da acetilcolina, competindo pelos receptores nicotínicos na membrana pós-sináptica, entretanto insensíveis à ação da acetilcolinesterase. Dessa forma, a ativação dos receptores é prolongada causando hiperexcitabilidade do sistema nervoso central, devido à transmissão contínua e descontrolada de impulsos nervosos (Faria, 2009). Os NEO foram pré-qualificados mais recentemente pela OMS, em formulações associadas a PI: imidacloprid e prallethrin, para uso em dispersão espacial; clothianidin e deltamethrin, para uso em borrifações de efeito residual (IRS - *indoor residual spraying*) (WHO, 2023a). O grupo butenolide possui somente um princípio ativo associado a piretróide com formulação pré-qualificada recentemente, flupyradifurone e transfluthrin, para uso em dispersão espacial *indoor* e *outdoor*. Possui modo de ação semelhante ao dos NEO, agindo como modulador competitivo de receptores nicotínicos da acetilcolina (Zahouli et al, 2023).

A partir de 2014, para o controle químico da espécie *Ae. aegypti* em áreas de transmissão de arboviroses, o Ministério da Saúde passou a recomendar a utilização a Ultra Baixo Volume (UBV) de malathion EW 44% (formulação *oil in water emulsion* ou, em português, emulsão de óleo em água em concentração 44%), e tratamento perifocal de efeito residual com o CA bendiocarb WP 80% (formulação *wettable powder* ou, em português, pó molhável em concentração 80%), assim como o tratamento dos criadouros não passíveis de remoção ou vedação com aplicação do larvicida piriproxifeno G 5% (formulação em grânulos e concentração 5%) a cada dois meses (informações obtidas no Ministério da Saúde por meio da Lei de Acesso à Informação). O uso de PPF em baixas concentrações pode inibir a emergência de mosquitos *Ae. aegypti* até o estágio adulto ao interromper sua metamorfose e reprodução, o que se espera que reduza o número de mosquitos em uma população (Maoz et al., 2017; Alomar et al., 2020; Alomar e Alto 2021, 2022).

Após análise dos resultados obtidos nos ensaios de resistência de *Ae. aegypti* aos inseticidas realizados em 2017 e 2018 (aqui apresentados posteriormente), o Ministério da Saúde optou pelo manejo dos produtos utilizados em saúde pública, a partir de 2020. Atualmente, para controle do vetor

adulto em situações emergenciais, malathion foi substituído pela combinação das moléculas imidacloprida (30 g/kg; 3% p/p) e pralethrin (7,5 g/kg; 0,75% p/p), em aplicações espaciais a UBV (Brasil, 2020a). Além disso, para aplicação residual foi adotada formulação de clothianidin (200mg, 50% p/p) e deltamethrin (25mg, 6,25% p/p) em pó molhável (Brasil, 2020b). O larvicida PPF foi substituído em 2021 por Espinosade DT 7,48% (formulação *tablet for direct application*), derivado da fermentação biológica da bactéria *Saccharopolyspora spinosa* (Brasil, 2021). O produto biológico *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bt), Cepa AM 65-52, na formulação WG 37,4% (formulação *water dispersible granules*, ou, em português, grânulos dispersáveis em água e concentração 37,4%), e potência aproximada 3.000 Bt UTI/mg (Unidades Tóxicas Internacionais por miligrama), passou a ser distribuído pelo Ministério da Saúde para o controle larvário do *Ae. aegypti* em alguns municípios, em 2022 (Brasil, 2022b).

A Fig. 4 mostra os inseticidas distribuídos pelo Ministério da Saúde do Brasil aos municípios especificamente para o controle de *Ae. aegypti*, desde 1980 (CGARB/DEDT/SVS/MS).



Notas: <sup>a</sup>Bti: uso somente em algumas cidades; <sup>b</sup>uso somente no estado de São Paulo. Siglas: UBV: aplicações espaciais em ultra baixo volume; Bti: *Bacillus thuringiensis*; OP: organofosforado; IGR: regulador do crescimento de insetos; CSI: inibidor de síntese de quitina; AHJ: análogo de hormônio juvenil; CA: carbamato; NEO: neonicotinoide.

**Figura 4.** Inseticidas distribuídos pelo Ministério da Saúde do Brasil especificamente para o controle de *Aedes aegypti*, 1980 – 2022.

Fonte: CGARB/DEDT/SVS/MS.

### 1.3. Resistência aos inseticidas

#### 1.3.1. Definição, tipos e mecanismos de resistência

A resistência é o desenvolvimento de uma habilidade em uma linhagem de um organismo em tolerar doses de tóxicos que seriam letais para a maioria da população normal (suscetível) da mesma espécie (Bergamin & Amorim, 1966), e já foi observada em mais de 500 espécies de insetos ao redor do mundo (Hemingway & Ranson, 2000). A propagação de resistência a inseticidas em populações de insetos está relacionada com a frequência de sua utilização e é resultante da pressão seletiva desses compostos tóxicos sobre estas populações e das características herdadas das espécies de insetos envolvidas (Dong, 2007; Silva, 2014). Com o uso contínuo e intensivo de um mesmo ingrediente ativo, a frequência de resistência de uma população poderá alcançar níveis em que a eficácia do produto é comprometida. Sendo assim, a suscetibilidade aos inseticidas em uso deve ser regularmente monitorada (Roush, 1989; WHO, 2012).

Quatro mecanismos envolvidos na resistência aos inseticidas em mosquitos são mais conhecidos: 1) alterações comportamentais; 2) alterações no exoesqueleto dos insetos que dificultam a penetração destes compostos; 3) mutações estruturais nas proteínas alvo desses compostos impedindo ou atrapalhando sua ligação (mutações no sítio-alvo); 4) aumento na capacidade de detoxificação do inseticida por maior capacidade de catalização ou ampliação da quantidade de enzimas produzidas (resistência metabólica) (David et al., 2013; Valle et al., 2015; Moyes et al., 2017).

A resistência comportamental é pouco estudada, e ocorre quando por alterações na resposta comportamental o inseto evita o contato com inseticidas (Ranson et al., 2011). Em um destes estudos do comportamento do *Anopheles sp.* foi demonstrado o efeito do uso de redes de cama sobre a alteração nos horários de busca pelo hospedeiro para repasto, reduzindo a atividade do período noturno, quando os humanos estão protegidos pelas redes, e aumentando as buscas por alimentação no crepúsculo, amanhecer ou durante o dia ao ar livre (Lefevre et al., 2009). Briet & Chitnis sugeriram em 2013 que o

impacto da resistência comportamental pode ser tão importante quanto o da resistência fisiológica sobre a eficácia das intervenções de controle.

Alterações no exoesqueleto dos insetos referem-se a modificações na cutícula que acabarão por retardar a penetração de moléculas inseticidas no corpo dos insetos. Espessamento cuticular e alteração da composição da cutícula são mecanismos já descritos de resistência à penetração (Balabanidou et al., 2018). A superexpressão de genes que codificam proteínas cuticulares foi relatada em cepas de *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Anopheles stephensi* e *Culex pipiens pallens* resistentes a inseticidas (Seixas et al., 2017). A análise de larvas de *Ae. aegypti* com resistência selecionada em laboratório à deltametrina e acetamiprida revelou cutículas 1,48 vezes e 1,97 vezes mais espessas em comparação à cepa parental, respectivamente. O aumento da espessura cuticular possivelmente inibiu a penetração do inseticida em larvas selecionadas (Samal & Kumar, 2021).

As modificações cuticulares são atribuídas à superexpressão de genes ou proteínas diversificadas, que pertencem a componentes estruturais (proteínas cuticulares principalmente), enzimas que catalisam reações enzimáticas (CYP4G16 e lacase 2) ou transportadores ABC que promovem a translocação cuticular. Na espécie *Ae. aegypti*, entretanto, a resistência a inseticidas tem sido associada principalmente aos mecanismos de resistência metabólica e mutações no sítio-alvo (Ferrari, 1996; Valle et al., 2015; Goindin et al., 2017).

A resistência metabólica ocorre quando há uma intensificação na atividade enzimática impedindo ou dificultando que o inseticida alcance seu sítio-alvo. Tal alteração pode ocorrer por mutações nos genes que codificam as enzimas, aumentando sua afinidade pelo inseticida ou a eficiência na catalização ou ainda por aumento na síntese enzimática por alteração da expressão ou amplificação gênica (Hemingway, 2000b, Valle et al., 2015). Carboxilesterases (EST), Glutathione S-Transferases (GST) e Oxidases de Função Mista (MFO ou citocromo P450) são as principais famílias de enzimas envolvidas na detoxificação dos inseticidas (Hemingway & Ranson, 2000; Silva, 2014). EST e MFO atuam na fase inicial de detoxificação promovendo modificações químicas nos inseticidas, e as GST transferem uma molécula do tripeptídeo glutathione para o substrato, atuando na fase de conjugação (Valle et al., 2015).

Populações de mosquitos da espécie *Ae. aegypti* resistentes a inseticidas com superexpressão de genes que codificam as enzimas de detoxificação citocromo P450 e GST foram relatadas em diversas localidades (Vontas et al., 2012; Smith et al., 2016). O aumento da expressão de GST foi associado a espécie *Ae. aegypti* resistentes a PI, assim como o de EST a populações resistentes aos OP (Montella et al., 2007). A superexpressão do citocromo P450 pode conferir resistência de populações de *Ae. aegypti* a ampla gama de inseticidas químicos. Frequentemente associada à resistência a PI embora outras enzimas de detoxificação também estejam implicadas nesse processo (David et al., 2013, Moyes et al., 2017), foi também associada à resistência ao inseticida biológico espinosina (Sparks et al., 2012; Valle et al., 2015).

A resistência ocorre pelo mecanismo de insensibilidade do sítio-alvo quando há uma alteração conformacional nas moléculas do inseto que interagem com o inseticida, prejudicando a ligação adequada da molécula de inseticida tornando-o menos tóxico ou ineficiente (Brogdon & McAllister, 1998; Hemingway et al., 2004). O número de mutações existentes que conferem resistência aos inseticidas é baixo, uma vez que poucas alterações no sistema nervoso, alvo dos inseticidas, não comprometem suas funções fisiológicas. As mesmas mutações podem ocorrer em diferentes espécies de insetos, sendo este um dos mais importantes mecanismos de resistência aos PI (Ffrench-Constant et al., 1998; Silva, 2014).

Algumas mutações não silenciosas no canal de sódio regulado por voltagem ( $Na_v$ ), alvo de inseticidas PI e do OC DDT, foram associadas à resistência aos inseticidas PI denominada 'kdr' (resistência ao *knockdown*). Efeito *knockdown* é a perda de coordenação e paralisia causada pelo inseticida, frequentemente acompanhados de espasmos e tremores, e resistência ao *knockdown* foi primeiramente relatada na espécie *Musca domestica* (Williamson et al., 1996). Foi sugerido que a substituição de um aminoácido leucina por fenilalanina no segmento hidrofóbico IIS6 (L1014F) resultou em um aumento moderado de resistência ao DDT (Schleier & Peterson, 2011; Silva et al., 2014).

Em mosquitos *Ae. aegypti*, as mutações do  $Na_v$  associadas à resistência ao *knockdown* são muito comuns. As mais relatadas são a F1534C, V1016G ou V1016I, que podem atuar conjuntamente em combinação com uma mutação adicional, S989P (Smith et al., 2016). A mutação F1534C pode ser encontrada

nos continentes Africano, Asiático e Americano, já a V1016G é encontrada na Ásia e V1016I nas Américas e, em baixa frequência, no Gana (Harris et al., 2010; Kushwah et al., 2015; Kawada et al., 2016; Moyes et al., 2017).

Tais alterações possuem caráter recessivo, portanto a resistência manifesta-se apenas quando a mutação ocorre em homozigose no indivíduo, favorecendo a disseminação do alelo que confere resistência aos PI na população (Marcombe et al., 2009b). A frequência crescente destas mutações em populações brasileiras de *Ae. aegypti* detectada, desde 2002, contribuiu para a interrupção do uso de PI no controle do *Ae. aegypti* em saúde pública no Brasil (Brasil, 2009b; Valle et al., 2015).

As mutações na acetilcolinesterase (AChE), sítio-alvo dos organofosforados, não ocorrem amplamente em mosquitos do gênero *Aedes* (Weill et al., 2004). Contudo, o monitoramento é importante devido à detecção da mutação 119S em uma população indiana (Muthusamy & Shivakumar, 2015) e a importância deste tipo de mutação na resistência a carbamatos e organofosforados (Labbe et al., 2007; Moyes et al., 2017).

Resistência cruzada ocorre quando um mecanismo confere resistência a mais de um inseticida, de mesma classe ou de classe diferente. A resistência múltipla é a ocorrência, em um inseto, de diferentes mecanismos capazes de conferir resistência a diferentes classes de inseticidas simultaneamente. A exposição frequente de populações a vários inseticidas de forma não racional, tanto pelos programas de saúde pública quanto por empresas privadas e pelo uso doméstico podem contribuir com a seleção de indivíduos com múltipla resistência (Valle et al., 2015). Uma estratégia racional de controle deve se basear em conhecimento detalhado sobre a distribuição territorial do vetor, sua susceptibilidade às distintas classes e mecanismos envolvidos na seleção da resistência, com o objetivo de reduzir os níveis de infestação vetorial e consequentemente a transmissão das arboviroses (Roush, 1989).

### **1.3.2. Histórico de resistência do mosquito *Ae. aegypti* aos inseticidas utilizados no seu controle, com ênfase para o Brasil**

O primeiro relato de resistência de *Ae. aegypti* a inseticidas ocorreu em Trinidad em 1955, quando foi relatada resistência ao DDT. Algum tempo depois o problema já ocorria em todas as regiões do Caribe, com resistência aos organoclorados DDT e dieldrin, quando toda a região passou a utilizar malathion para aspersão espacial na região (Camargo, 1967). Os primeiros casos de resistência aos organofosforados, carbamatos e piretróides foram relatados em diversos países a partir de 1989 (Lee & Lime, 1989; Mazzari & Georghiou, 1995; Rawlins & Wan, 1995; BissetLazcano et al., 2009). A resistência de *Ae. aegypti* aos inseticidas no Brasil foi detectada inicialmente ao OP temefós nos estados de Goiás e São Paulo, em 1995 (Macoris et al., 1995) e aos piretróides nos estados Alagoas, Sergipe e Rio de Janeiro, em 2001 (Cunha et al., 2005). Poucos anos depois foi detectada a redução da persistência do temefós em estudos de campo, assim como alteração da suscetibilidade para fenitrothion e malathion em populações provenientes dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Rondônia e Minas Gerais (Lima, 2003). Em 2001, a resistência ao PI cipermetrina foi detectada por meio de ensaios de garrafa em populações procedentes do estado do Rio de Janeiro. Os autores registraram mortalidade menor que 80% ao inseticida, e provável mutação kdr nos canais de sódio (Cunha et al., 2005). Segundo a OMS, a resistência aos organofosforados e piretróides está presente em larga escala na maioria das regiões, onde o mosquito *Ae. aegypti* está estabelecido (WHO, 2013).

Diante desse cenário, o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) implementou, em 1999, a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Ae. aegypti* a Inseticidas (MoReNAa), com a finalidade de subsidiar tecnicamente as decisões para o controle químico do *Ae. aegypti* no país. A Rede monitorou sistematicamente a suscetibilidade de populações provenientes de localidades consideradas prioritárias ou estratégicas para as intervenções de controle do mosquito em aproximadamente 80 municípios, incluindo aqueles com alta incidência de dengue, mais populosos, com altos índices de infestação e todas as capitais dos estados, avaliados a cada dois anos (Brasil, 2006). Bioensaios qualitativos e quantitativos para detecção e

mensuração de resistência de larvas foram realizados de acordo com a metodologia da OMS (WHO, 2016a). Já a resistência de mosquitos adultos foi avaliada por meio de bioensaios utilizando-se a metodologia de garrafas impregnadas com o inseticida avaliado, recomendada pelos Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (CDC, 2010), ou por meio de tubos contendo papel impregnado com o inseticida diluído em azeite de oliva (OP e CA) ou óleo de silicone (PI), conforme recomendado pela OMS (WHO, 2016a).

Divergências de resultados quando comparadas as duas metodologias de bioensaios para avaliação de resistência de mosquitos adultos (CDC e WHO) foram relatadas. Para Ledoux et al. (2020), a comparação do *status* de suscetibilidade de populações de *Ae. aegypti* avaliadas utilizando-se estas diferentes metodologias variou com o inseticida testado, tendo relatado importantes inconsistências dos resultados de suscetibilidade de algumas populações à deltametrina e similaridades entre os resultados de diferentes populações expostas a outros piretróides. Em estudo de Pareja-Loaiza et al. (2020), populações Colombianas de *Ae. aegypti* classificadas como suscetíveis a piretróides em ensaios com a metodologia de garrafas apresentaram resistência aos mesmos inseticidas, em ensaios com tubos. O oposto foi observado por Aizoun et al. (2013) e Fonseca et al. (2009), que ao avaliar a suscetibilidade de mosquitos *Anopheles gambiae* à deltametrina e *Anopheles nuneztovari* ao fenitrothion, relataram suscetibilidade utilizando-se a metodologia de tubos e resistência nos ensaios em garrafas, metodologia na qual o tempo de exposição ao inseticida (tempo diagnóstico) foi consideravelmente menor. Hipótese levantada pelos autores para explicar tais resultados foi a influência dos diferentes mecanismos de resistência das populações avaliadas. Resistência causada por mutação *kdr* ocasiona a não ocorrência do *knock down* nos mosquitos aos 30 minutos e sua contabilização como resistentes, o que não ocorre se o principal mecanismo de resistência for metabólico, já que os mosquitos deverão se recuperar do efeito *knock-down* após as enzimas de detoxificação metabolizarem o inseticida, de acordo com Pareja-Loaiza e coautores (2020). Owusu e colaboradores consideraram, em 2015, que a comparação direta entre os resultados das diferentes metodologias não pode ser realizada, já que o tempo *knock-down* no ensaio de garrafa (CDC) é um mau preditor da mortalidade em 24 horas no ensaio do tubo (WHO).

Uma limitação de uso da metodologia do tubo da OMS é a possível dificuldade para obtenção dos papéis impregnados com inseticidas, necessários aos bioensaios. O material certificado pela OMS é produzido atualmente apenas na University Saints Malaysia (Penang, Malásia) e as dificuldades para sua aquisição e importação contribuem para que o método de garrafas impregnadas seja mais utilizado na região da América Latina (Ledoux et al., 2020).

A identificação de mecanismos de resistência das populações brasileiras de *Ae. aegypti* pela Rede MoReNAa foi realizada por meio de ensaios bioquímicos, para quantificação de alterações da atividade enzimática e genotipagem de mutações *kdr*, com o objetivo de investigar as bases moleculares da seleção da resistência a inseticidas (Linss et al, 2014; Viana-Medeiros et al, 2017; Macoris et al., 2018). Tais resultados ajudaram a apoiar a decisão técnica sobre a substituição de inseticidas utilizados para o controle desta espécie em saúde pública no país (Braga & Valle, 2007; Brasil, 2006).

Baseado no aumento da detecção de populações de *Ae. aegypti* resistentes ao temefós e na busca de alternativas viáveis para controle larvário, o produto foi substituído pelo larvicida biológico *Bti* em alguns municípios considerados críticos no ano 2000. O uso de *Bti* entretanto encontrou dificuldades operacionais, uma vez que sua produção em larga escala em formulações suficientemente persistentes em condições ambientais, especialmente sob exposição solar, é uma importante limitação (Lima et al., 2016; Parra & Coelho Junior, 2019). Nos anos seguintes, o monitoramento da resistência de populações brasileiras de *Ae. aegypti* ao temefós demonstrou que cerca de 50% dos municípios brasileiros apresentava mortalidades de populações de mosquitos expostos a esse inseticida inferiores a 80%. Com o uso intenso do larvicida, este cenário foi se agravando nos anos posteriores atingindo níveis que poderiam comprometer as ações de controle vetorial (Chediak et al., 2016).

Foram realizados ensaios de avaliação de eficácia de alguns produtos recomendados pela OMS sobre populações de campo sensíveis e resistentes ao larvicida (Lima, 2003; Braga & Valle, 2007), optando-se a partir de 2009 pela adoção dos IGR em todo o país com início do inibidor de síntese de quitina diflubenzuron, seguido pelo novaluron (Brasil, 2009a). A utilização do análogo de hormônio juvenil PPF ocorreu a partir de 2013, baseada na intenção de

rotação de inseticidas com distintos modos de ação e devido à resistência de *Ae. aegypti* a outros inseticidas, incluindo piretroides e organofosforados (Lima et al., 2011; Campos et al., 2020). O PPF atua garantindo a manutenção do caráter imaturo dos insetos ao interferir em seu sistema endócrino, inibindo o desenvolvimento de suas características adultas como asas, maturação dos órgãos reprodutivos e genitália externa. A metamorfose pode acontecer de forma incompleta ou nem acontecer, mantendo-os no estágio de larva por até 20 dias, resultando em adultos malformados ou estéreis (Valle et al., 2015; Alomar et al., 2020; Alomar & Alto, 2021; Alomar & Alto, 2022).

A Tabela 1 apresenta os quantitativos de piriproxifeno e malathion distribuídos pelo Ministério da Saúde do Brasil às Secretarias Estaduais de Saúde para repasse aos municípios, especificamente para o controle de *Aedes aegypti*, desde o início da utilização do PPF.

**Tabela 1.** Quantidade de piriproxifeno e malathion distribuídos pelo Ministério da Saúde do Brasil especificamente para o controle de *Aedes aegypti*, 2014 – 2019.

Região	Estado	Piriproxifeno 0.5 G*							Malathion EW 44% <sup>1</sup>						
		2014	2015	2016	2017	2018	2019	Total (kg, 2014*	2015	2016	2017	2018	2019 <sup>4</sup>	Total (L)	
N	Acre	707	1000	1500	500	1500	0	5207	1000	1600	2000	3200	8000	8000	23800
N	Amazonas	100	290	200	100	100	0	790	4000	6000	11000	20000	23000	0	64000
N	Amapá	100	70	0	130	0	60	360	2000	0	0	0	0	0	2000
N	Pará	800	1580	2400	1540	630	2410	9360	0	0	1000	0	0	2000	3000
N	Rondônia	100	280	170	200	300	0	1050	0	3000	34000	0	4000	3000	44000
N	Roraima	60	60	140	70	140	0	470	0	4000	7200	22000	12000	0	45200
N	Tocantins	400	580	500	800	400	250	2930	0	7200	5400	8000	3000	10800	34400
NE	Alagoas	2600	5800	7600	5300	6800	8300	36400	0	17000	2800	0	2000	1000	22800
NE	Bahia	5000	25000	26200	19500	34300	27330	137330	0	13000	43800	20000	23000	25600	125400
NE	Ceará	5500	14800	19000	19000	22200	16500	97000	0	200	46000	80000	23000	25000	174200
NE	Paraíba	1200	5350	12500	1000	6000	6500	32550	0	800	20600	10000	9500	6000	46900
NE	Pernambuco	6018	14000	18100	17000	16900	12000	84018	0	22600	20000	5000	9000	13000	69600
NE	Piauí	600	1900	1920	1800	1300	1400	8920	800	4000	14600	15000	6000	5000	45400
NE	Rio Grande do	2600	5400	7600	4200	7000	4200	31000	0	11600	28400	6000	37000	5000	88000
NE	Maranhão	700	4000	5850	4000	3000	5500	23050	0	4000	35000	20400	30000	17000	106400
NE	Serqipe	800	1200	1120	1200	800	1500	6620	0	19600	17600	15000	0	8000	60200
CO	Distrito Federal	100	510	280	0	400	400	1690	0	2800	11800	0	0	5800	20400
CO	Goiás	1100	1050	450	300	50	250	3200	6000	28000	25000	12600	23600	8000	103200
CO	Mato Grosso do	800	400	800	300	400	520	3220	5000	30200	49600	25000	35000	18600	163400
CO	Mato Grosso	1000	800	1900	1000	1200	600	6500	0	8000	8000	4800	20200	0	41000
SE	Espírito Santo	800	700	1020	1100	1200	1100	5920	0	20000	23000	11000	12000	9000	75000
SE	Rio de Janeiro	800	3700	4220	4309	6000	3900	22929	0	13000	20000	11199	17800	6000	67999
SE	Minas Gerais	4190	8900	9200	8500	13200	6500	50490	0	26800	129200	38000	72000	75000	341000
SE	São Paulo	1040	1200	4500	1000	1000	1600	10340	14000	135600	78000	15000	40000	50000	332600
S	Paraná	800	500	900	500	500	600	3800	5000	69000	102200	25000	25000	40000	266200
S	Rio Grande do Sul	140	680	700	200	300	500	2520	0	1000	2600	200	300	400	4500
S	Santa Catarina	50	380	280	200	200	150	1260	0	5000	1000	0	400	400	6800
	Brasil	38105	100130	129050	93749	125820	102070	588924	37800	454000	739800	367399	435800	342600	2377399

Fonte: Ministério da Saúde (MS). Notas: \*Piriproxifeno 0,5 G: formulação de grânulos a uma concentração de 5 g/kg, relatada em quilogramas. <sup>1</sup>Malathion EW 44%: formulação de emulsão de óleo em água (Ew) a uma concentração de 440 g/L, relatada em litros. \*Quantidade de Malathion GT, formulação de concentrado emulsionável (CE) distribuída até 2014, não foi informada pelo Ministério da Saúde. <sup>4</sup>O Ministério da Saúde coletou de volta a quantidade total de 225.000 litros de malathion não utilizado em 2019 devido à precipitação do produto nos galões de estoque.

Existem poucos relatos de resistência aos IGR, por serem inseticidas de uso recente em saúde pública. Algumas alterações de suscetibilidade ao piriproxifeno foram observadas em populações de *Ae. aegypti* da Martinica (RR<sub>50</sub> 2,2; RR<sub>95</sub> 1,9), em 2007 (Marcombe et al., 2011), e *Ae. albopictus* dos Estados Unidos (RR<sub>50</sub> 1,8 - 2,4) (Marcombe et al., 2014). As maiores alterações, no entanto, foram observadas em mosquitos *Ae. aegypti* da Malásia (RR<sub>50</sub> 6,1) (Lau et al., 2015) e dos Estados Unidos (RR<sub>50</sub> 38,7; RR<sub>90</sub> 81,5), em 2015 (Su et al., 2019).

Andrighetti et al. (2008), Rodríguez et al. (2013) e Lau et al. (2015) registraram populações de mosquitos suscetíveis ao PPF e resistentes ao temefós apresentando concentrações letais aumentadas, quando comparadas às populações de referência. Marcombe et al. (2014) sugeriram resistência cruzada entre IGRs e temefós envolvendo mecanismo de base metabólica, após encontrarem diferenças significativas nas atividades das enzimas de detoxificação em populações de *Ae. albopictus* resistentes (Hustedt et al., 2020).

Foram descritas, em 2008, alterações de suscetibilidade ao PPF em populações de *Ae. aegypti* provenientes de Salvador e Barreiras no estado da Bahia (RR<sub>95</sub> 5,5 e 1,5, respectivamente). Nesse mesmo ano, também se registrou na cidade de Bauru, no estado de São Paulo uma RR<sub>95</sub>=3,5, conforme demonstrado por Andrighetti et al. (2008). Ensaio laboratoriais realizados em 2017/18 por Moreira (2018) e por Carvalho e colaboradores (2020) detectaram alterações em diferentes populações de *Ae. aegypti* provenientes do Distrito Federal (RR<sub>50</sub> 1,42 – 2,21 e RR<sub>50</sub> 1,7 - 7,7; respectivamente).

OP malathion começou a ser empregado para controle de *Ae. aegypti* adultos no Brasil nas aplicações a Ultra Baixo Volume (UBV) e pulverização residual na década de 80, tendo sido substituído pelo OP fenitrothion para pulverização residual em 1989, porém mantido no tratamento a UBV pelos 10 anos seguintes. Em 1999 os OP foram substituídos pelo PI cipermetrina para controle de adultos (UBV e residual) em todo o país, com exceção do estado de São Paulo, que já havia realizado este manejo dez anos antes (Macoris et al., 2007). Após anos sem ser usado no controle de *Ae. aegypti* adultos, malathion foi novamente adotado com a introdução dos IGR para controle larvário em todo o país desde 2009 (Valle et al., 2019).

Os OP são derivados do ácido fosfórico e seus homólogos, e têm como mecanismo de ação a inibição da enzima colinesterase (Valle et al., 2015). Resistência ao malathion foi documentada em populações de *Ae. aegypti* provenientes de Laos, no Sudeste Asiático, com taxas de mortalidade variando entre 33 e 98% (Marcombe et al., 2019). Níveis moderados de resistência foram também relatados em Aruba, Jamaica, Trindade, Porto Rico, St. Lucia e Antigua, e níveis baixos em Guadalupe e Saint Martin (Goindin et al., 2017), na região do Caribe (Rawlins & Wan, 1995). No Brasil, baixas taxas de mortalidade de *Ae. aegypti* a este inseticida foram registradas em municípios do estado de São Paulo e de estados da região Nordeste do país, sendo a menor mortalidade relatada 42,6% em Santos/São Paulo (Macoris et al., 2007).

## 2. JUSTIFICATIVA

Dengue, febre do chikungunya e febre do Zika apresentam importância crescente no mundo ocasionando milhares de óbitos todos os anos em diversos países. No Brasil, *Ae. aegypti* é considerada a principal espécie vetora e o controle químico é a principal ferramenta para redução da densidade populacional dessa espécie.

Com o uso continuado dos piretróides e organofosforados para controle da espécie *Ae. aegypti*, a possibilidade de seleção de indivíduos resistentes torna-se maior, constituindo-se em importante ameaça ao controle da transmissão das arboviroses, uma vez que as populações de campo passam a ser capazes de sobreviver quando entram em contato com os inseticidas. Conseqüentemente, podem sustentar a transmissão de arboviroses de forma contínua e contígua em locais em que não se consegue atingir sua redução em níveis esperados, após aplicação de larvicidas ou adulticidas.

Portanto, torna-se fundamental a melhor compreensão do perfil de resistência de populações de *Ae. aegypti* aos inseticidas de uso em saúde pública e sua distribuição no território nacional, a fim de contribuir com a elaboração de propostas de estratégias de controle vetorial mais efetivas para reduzir as populações do vetor e, conseqüentemente a transmissão de arbovirus.

A resistência aos inseticidas (RI) pode ter um custo na biologia dos insetos, afetando suas características de história de vida, como desenvolvimento larvário, competição sexual, suscetibilidade à predação e competência vetorial (Paris et al., 2011; Martins et al., 2012; Diniz et al., 2015; Ndiath, 2019). Sabe-se que a RI pode afetar os esforços de controle de vetores e prevenção de epidemias; entretanto, poucos estudos avaliaram sua influência sobre a competência do vetor *Ae. aegypti* para arbovírus. Até onde sabemos, nenhum estudo foi publicado avaliando a associação entre resistência ao PPF e a capacidade do vetor se infectar, manter e transmitir arbovírus. Aqui, testamos a hipótese de que a competência vetorial em populações brasileiras de *Ae. aegypti* pode variar de acordo com o nível de resistência do PPF.

## 2.1. Perguntas de pesquisa

Considerando as justificativas apresentadas, buscamos por meio deste estudo responder às seguintes perguntas:

- Qual era, em 2017/2018, o perfil de suscetibilidade/resistência de diferentes populações brasileiras aos inseticidas usados para seu controle?
- Os níveis de resistência ao PPF em populações de mosquitos *Ae. aegypti* apresentaram alteração em 2020, com a continuidade de uso regular do produto para o controle larvário?
- A probabilidade um mosquito (corpo, pernas e saliva) de determinada população ter sido infectado pelo ZIKV pode ser influenciada pelo nível de resistência da população ao PPF?
- Os títulos de ZIKV em amostras de mosquitos resistentes (corpo, pernas e saliva) podem ser influenciados pelo nível de resistência desta população ao PPF?

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

- Monitorar o perfil de resistência de populações brasileiras da espécie *Ae. aegypti* ao inseticida PPF, avaliar sua resistência ao malathion e analisar a capacidade de infecção do vírus Zika em populações resistentes de *Ae. aegypti* ao larvicida PPF.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Analisar a suscetibilidade de populações brasileiras do mosquito *Ae. aegypti* ao IGR PPF e ao OP malathion, durante 2017 e 2018 (Artigo 1 – Anexo X);
- Reavaliar, em 2020, a resistência ao PPF nas populações de *Ae. aegypti* que apresentaram resistência ao produto em 2017 e 2018 (Artigo 2 – Anexo XI);
- Analisar a relação entre os diferentes níveis de resistência de *Ae. aegypti* ao PPF e a capacidade de infecção por ZIKV (Artigo 3 – Anexo XII).

## 4. MÉTODOS

Para um melhor entendimento do leitor, os métodos desta tese serão divididos em três partes. A primeira parte contém os métodos da avaliação da suscetibilidade de populações de campo de *Ae. aegypti* ao PPF e malathion em 2017 – 2018. A segunda trata-se sobre nova avaliação da suscetibilidade das populações de campo de *Ae. aegypti* ao PPF. Essa avaliação foi realizada em populações do mosquito coletadas, em 2020, nos mesmos municípios onde foi anteriormente detectada resistência ao larvicida. A terceira parte destaca a análise da suscetibilidade de populações de *Ae. aegypti* resistentes ao PPF à infecção por vírus Zika.

### 4.1. Avaliação da suscetibilidade de populações de campo de *Ae. aegypti* ao PPF e malathion em 2017- 2018

#### 4.1.1. Populações de estudo avaliadas em 2017 – 2018 e método de coleta de amostras

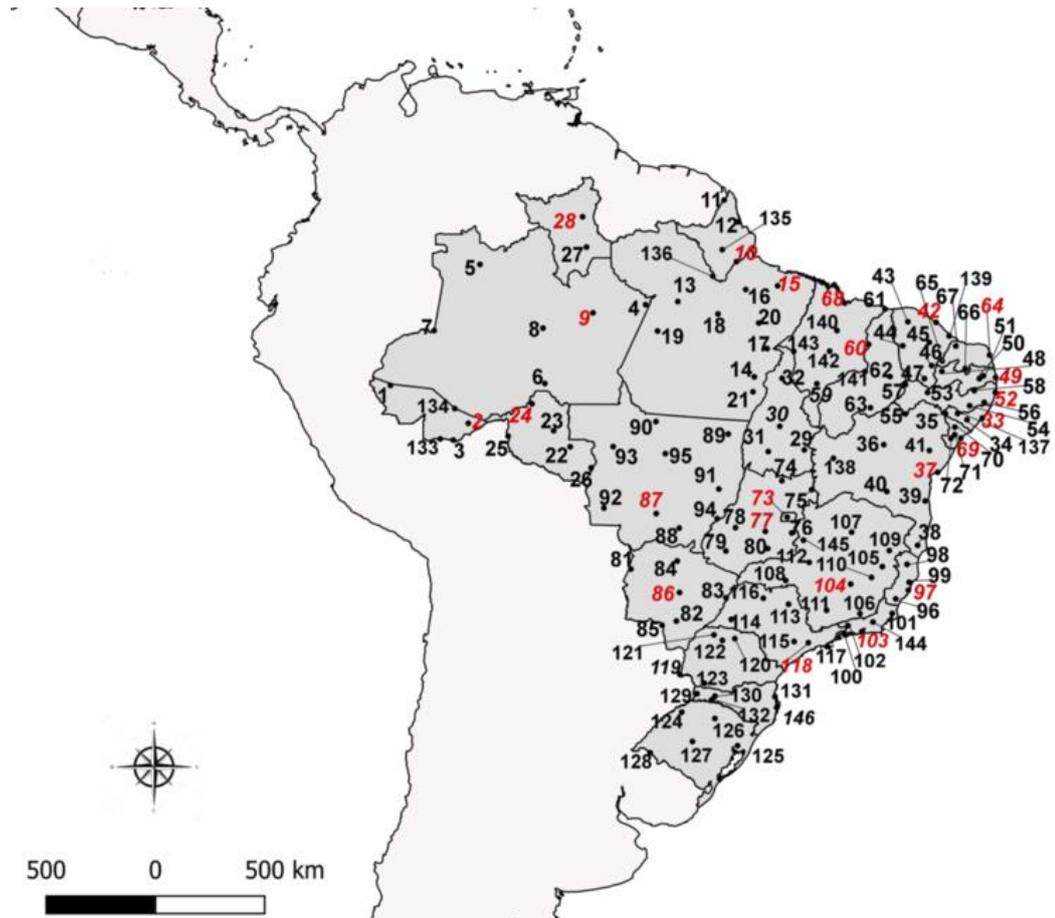
Para avaliar a suscetibilidade/resistência das populações brasileiras de mosquitos *Ae. aegypti* para os inseticidas empregados em saúde pública no país, selecionamos 146 municípios (Tabela 2, Fig. 5) com base em uma proposta de representação geográfica. Os pontos de amostragem consideraram diversas áreas no território nacional brasileiro, cobrindo um grande número de cidades em menores distâncias, em conglomerados urbanos com alta densidade populacional, conforme sugerido por Chediak et al. (2016), e preferencialmente em locais previamente avaliados durante o esforço de 12 anos da Rede MoReNAa, conforme descrito por Valle et al. (2019). Escolhemos preferencialmente as capitais dos estados, as fronteiras internacionais e as cidades com dados anteriores de resistência a inseticidas. Essa proposta foi ajustada considerando-se também a capacidade operacional das equipes

municipais, de forma que se realizassem as coletas nos 146 municípios no decorrer de um ano e sete meses, entre 2017 e 2018 (Anexo I).

**Tabela 2.** Municípios participantes do monitoramento de suscetibilidade de populações de *Aedes aegypti* ao PPF e malathion, entre 2017 a 2018, no Brasil.

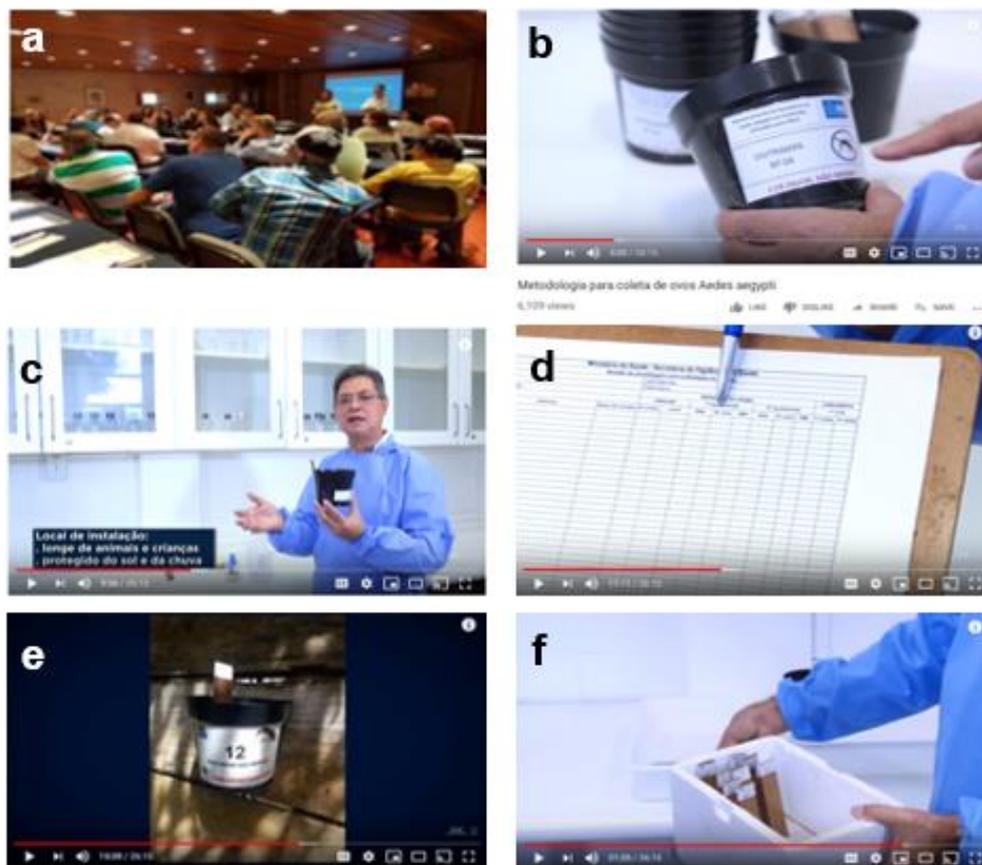
Nº	Latitude	Longitude	Região	Estado	Cidade	Nº	Latitude	Longitude	Região	Estado	Cidade
1	-7,363	-72,673	N	AC	Cruzeiro do Sul	74	-13,535	-48,224	CO	GO	Minaçu
2	-9,978	-67,811	N	AC	<u>Rio Branco</u>	75	-14,088	-46,362	CO	GO	Posse
3	-11,016	-68,748	N	AC	Brasileia	76	-16,769	-47,607	CO	GO	Cristalina
4	-2,627	-56,736	N	AM	Parintins	77	-16,673	-49,256	CO	GO	<u>Goiânia</u>
5	-0,136	-67,084	N	AM	São Gabriel da Cachoeira	78	-16,440	-51,120	CO	GO	Iporá
6	-7,512	-63,027	N	AM	Humaitá	79	-17,886	-51,721	CO	GO	Jataí
7	-4,232	-69,946	N	AM	Tabatinga	80	-17,735	-49,110	CO	GO	Morrinhos
8	-4,084	-63,142	N	AM	Coari	81	-19,006	-57,649	CO	MS	Corumbá
9	-3,135	-60,023	N	AM	<u>Manaus</u>	82	-22,227	-54,811	CO	MS	Dourados
10	0,039	-51,057	N	AP	<u>Macapá</u>	83	-20,789	-51,710	CO	MS	Três Lagoas
11	3,851	-51,831	N	AP	Oiapoque	84	-18,508	-54,758	CO	MS	Coxim
12	2,497	-50,945	N	AP	Calçoene	85	-22,486	-55,711	CO	MS	Ponta Porã
13	-2,436	-54,719	N	PA	Santarém	86	-20,458	-54,616	CO	MS	<u>Campo Grande</u>
14	-7,102	-49,943	N	PA	Xinguara	87	-15,570	-56,073	CO	MT	<u>Cuiabá</u>
15	-1,460	-48,488	N	PA	<u>Belém</u>	88	-16,470	-54,634	CO	MT	Rondonópolis
16	-1,691	-50,481	N	PA	Breves	89	-10,641	-51,571	CO	MT	Confresa
17	-5,353	-49,142	N	PA	Marabá	90	-9,872	-56,092	CO	MT	Alta Floresta
18	-3,206	-52,214	N	PA	Altamira	91	-14,049	-52,159	CO	MT	Água Boa
19	-4,264	-55,990	N	PA	Itaituba	92	-15,230	-59,338	CO	MT	Pontes e Lacerda
20	-3,767	-49,667	N	PA	Tucuruí	93	-11,422	-58,762	CO	MT	Juína
21	-8,028	-50,030	N	PA	Redenção	94	-15,889	-52,260	CO	MT	Barra do Garças
22	-11,434	-61,443	N	RO	Cacoal	95	-11,858	-55,501	CO	MT	Sinop
23	-10,436	-62,476	N	RO	Jaru	96	-20,850	-41,112	SE	ES	Cachoeiro do Itapemirim
24	-8,769	-63,831	N	RO	<u>Porto Velho</u>	97	-20,320	-40,322	SE	ES	<u>Vitória</u>
25	-10,774	-65,324	N	RO	Guajará-Mirim	98	-18,713	-40,402	SE	ES	Nova Venécia
26	-12,741	-60,139	N	RO	Vilhena	99	-19,823	-40,276	SE	ES	Aracruz
27	0,937	-60,425	N	RR	Rorainópolis	100	-23,009	-44,320	SE	RJ	Angra dos Reis
28	2,817	-60,671	N	RR	<u>Boa Vista</u>	101	-21,752	-41,330	SE	RJ	Campos dos Goytacazes
29	-11,625	-46,820	N	TO	Dianópolis	102	-22,510	-44,094	SE	RJ	Volta Redonda
30	-10,163	-48,351	N	TO	<u>Palmas</u>	103	-22,877	-43,228	SE	RJ	<u>Rio de Janeiro</u>
31	-11,730	-49,071	N	TO	Gurupi	104	-19,938	-43,926	SE	MG	<u>Belo Horizonte</u>
32	-7,191	-48,209	N	TO	Araguaína	105	-18,853	-41,947	SE	MG	Governador Valadares
33	-9,661	-35,702	NE	AL	<u>Maceió</u>	106	-21,761	-43,349	SE	MG	Juiz de Fora
34	-9,756	-36,657	NE	AL	Arapiraca	107	-16,723	-43,865	SE	MG	Montes Claros
35	-9,385	-37,999	NE	AL	Delmiro Gouveia	108	-19,714	-47,984	SE	MG	Uberaba
36	-11,303	-41,859	NE	BA	Irecê	109	-17,863	-41,510	SE	MG	Teófilo Otoni
37	-13,015	-38,488	NE	BA	<u>Salvador</u>	110	-19,525	-42,624	SE	MG	Coronel Fabriciano
38	-17,538	-39,745	NE	BA	Teixeira de Freitas	111	-21,557	-45,432	SE	MG	Varginha
39	-14,789	-39,273	NE	BA	Itabuna	112	-18,593	-46,516	SE	MG	Patos de Minas
40	-14,205	-41,667	NE	BA	Brumado	113	-21,185	-47,805	SE	SP	Ribeirão Preto
41	-11,660	-39,008	NE	BA	Serrinha	114	-22,123	-51,387	SE	SP	Presidente Prudente
42	-3,724	-38,590	NE	CE	<u>Fortaleza</u>	115	-23,499	-47,458	SE	SP	Sorocaba
43	-3,688	-40,349	NE	CE	Sobral	116	-20,813	-49,381	SE	SP	São José do Rio Preto
44	-5,177	-40,668	NE	CE	Crateús	117	-23,807	-45,403	SE	SP	São Sebastião
45	-4,964	-39,012	NE	CE	Quixadá	118	-23,567	-46,570	SE	SP	<u>São Paulo</u>
46	-6,403	-38,863	NE	CE	Icó	119	-25,542	-54,587	S	PR	Foz do Iguaçu
47	-7,211	-39,317	NE	CE	Juazeiro do Norte	120	-23,312	-51,163	S	PR	Londrina
48	-6,763	-38,230	NE	PB	Sousa	121	-23,082	-52,462	S	PR	Paranavá
49	-7,149	-34,873	NE	PB	<u>João Pessoa</u>	122	-23,422	-51,940	S	PR	Maringá
50	-7,221	-35,884	NE	PB	Campina Grande	123	-26,078	-53,056	S	PR	Francisco Beltrão
51	-7,037	-35,634	NE	PB	Alagoa Grande	124	-27,867	-54,478	S	RS	Santa Rosa
52	-8,063	-34,889	NE	PE	<u>Recife</u>	125	-29,946	-50,991	S	RS	Gravataí
53	-8,071	-39,121	NE	PE	Salgueiro	126	-28,262	-52,407	S	RS	Passo Fundo
54	-8,889	-36,493	NE	PE	Garanhuns	127	-29,686	-53,809	S	RS	Santa Maria
55	-9,397	-40,500	NE	PE	Petrolina	128	-30,383	-56,454	S	RS	Quaraí
56	-8,679	-35,588	NE	PE	Palmares	129	-26,726	-53,519	S	SC	São Miguel do Oeste
57	-7,578	-40,502	NE	PE	Araripina	130	-26,875	-52,405	S	SC	Xanxerê
58	-7,955	-36,204	NE	PE	Santa Cruz do Capibaribe	131	-26,907	-48,657	S	SC	Itajaí
59	-6,770	-43,021	NE	PI	Floriano	132	-27,107	-52,617	S	SC	Chapecó
60	-5,086	-42,805	NE	PI	<u>Teresina</u>	133	-10,943	-69,563	N	AC	Assis Brasil
61	-2,903	-41,778	NE	PI	Parnaíba	134	-9,065	-68,656	N	AC	Sena Madureira
62	-7,081	-41,469	NE	PI	Picos	135	0,777	-51,947	N	AP	Pedra Branca do Amapari
63	-9,015	-42,692	NE	PI	São Raimundo Nonato	136	-0,856	-52,539	N	AP	Laranjal do Jari
64	-5,751	-35,252	NE	RN	<u>Natal</u>	137	-9,372	-37,245	NE	AL	Santana do Ipanema
65	-6,115	-38,203	NE	RN	Pau dos Ferros	138	-12,145	-45,004	NE	BA	Barreiras
66	-6,586	-36,775	NE	RN	Jardim do Seridó	139	-4,567	-37,773	NE	CE	Aracati
67	-5,194	-37,357	NE	RN	Mossoró	140	-4,232	-44,782	NE	MA	Bacabal
68	-2,532	-44,298	NE	MA	<u>São Luís</u>	141	-7,531	-46,039	NE	MA	Balsas
69	-10,907	-37,048	NE	SE	<u>Aracaju</u>	142	-5,508	-45,239	NE	MA	Barra do Corda
70	-10,216	-37,420	NE	SE	Nossa Senhora da Glória	143	-5,527	-47,480	NE	MA	Imperatriz
71	-10,686	-37,427	NE	SE	Itabaiana	144	-22,286	-42,533	SE	RJ	Nova Friburgo
72	-10,915	-37,666	NE	SE	Lagarto	145	-17,220	-46,875	SE	MG	Paracatu
73	-15,794	-47,888	CO	DF	<u>Brasília</u>	146	-27,588	-48,548	S	SC	<u>Florianópolis</u>

Notas: Sublinhado: Capitais de estados. Siglas de estados: N: Norte, NE: Nordeste, CO: Centro-Oeste, SE: Sudeste, S: Sul. Siglas de estados: AC: Acre, AM: Amazonas, AP: Amapá, PA: Pará, RO: Rondônia, RR: Roraima, TO: Tocantins, AL: Alagoas, BA: Bahia; CE: Ceará, PB: Paraíba, PE: Pernambuco, PI: Piauí, RN: Rio Grande do Norte, MA: Maranhão, SE: Sergipe, DF: Distrito Federal, GO: Goiás, MS: Mato Grosso do Sul, ES: Espírito Santo, RJ: Rio de Janeiro, MG: Minas Gerais, SP: São Paulo, PR: Paraná, RS: Rio Grande do Sul, SC: Santa Catarina.



**Figura 5.** Mapa brasileiro mostrando os municípios participantes da rodada de monitoramento de 2017-2018 de suscetibilidade ao piriproxifeno e malathion em *Aedes aegypti*. Os números em vermelho representam as capitais dos estados. As linhas contínuas no território brasileiro delimitam os diferentes estados do país

Populações de campo de mosquitos *Ae. aegypti* foram coletados pelos Agentes de Controle de Endemias de cada cidade, utilizando de 100 a 300 armadilhas de oviposição (ovitrapas) em cada cidade, de acordo com o número de casas e seguindo a metodologia indicada pela Rede MoReNAa em 2008 (Brasil, 2008), orientada por um vídeo com procedimentos passo a passo (<https://www.youtube.com/watch?v=2w89kagSOKM>) para garantir que as coletas fossem feitas da forma mais homogênea possível (Fig. 6). Além do vídeo, foi produzida uma cartilha instrucional com a metodologia para amostragem de *Ae. aegypti* por meio de armadilhas de postura (Anexo II). A amostragem foi realizada em todo o território nacional.



**Figura 6.** (a) Reunião com representantes estaduais dos Programas de Controle do *Aedes* e laboratórios de entomologia para apresentação do projeto. Vídeo instrucional padronizando a metodologia para coleta e envio de ovos de *Aedes aegypti*, contendo: (b) apresentação da armadilha de oviposição e forma de identificação, (c) orientação sobre locais de instalação da armadilha, (d) preenchimento do boletim de campo, (e) demonstração da armadilha instalada no peridomicílio e (f) forma de acondicionamento das paletas para envio ao laboratório. O vídeo foi disponibilizado no Canal do Instituto Oswaldo Cruz, na plataforma eletrônica YouTube (<https://www.youtube.com/watch?v=2w89kagSOKM>).

As armadilhas foram instaladas no terreno de casas distribuídas uniformemente, com cobertura total do território urbano. Como atrativos para fêmeas grávidas, utilizamos uma solução de extrato de levedura a 0,04%. A fim de facilitar a preparação desta solução em campo, os agentes receberam um tubo cônico de 50 mL contendo 6 g de extrato de levedura comercial (Arma Zen®). Durante a instalação da armadilha, os tubos foram preenchidos com água da torneira até a marca de 50mL e homogeneizados. Com o auxílio da pipeta plástica de Pasteur, 1 mL desta solução foi adicionado à armadilha e depois preenchido com água da torneira até a marca de 300 mL. As armadilhas foram

mantidas nos domicílios por 15 dias, com uma troca das paletas e da solução atraente no final da primeira semana. As paletas contendo os ovos foram secas em temperatura ambiente durante 2 a 3 dias antes de serem enviadas aos laboratórios.

A coleta das amostras na totalidade de municípios selecionados foi iniciada em agosto de 2017, tendo sido finalizada no último município a instalar as ovitrampas em dezembro de 2018. Foi planejado um cronograma escalonado para que os ensaios fossem realizados ao longo de todo esse período, de forma a não sobrecarregar os laboratórios. As amostras coletadas em campo foram inicialmente enviadas para um laboratório central de entomologia em seus respectivos estados, que confirmou o correto registro da amostragem nos locais de origem e o armazenamento adequado das paletas. As paletas foram então enviadas para o LAFICAVE/IOC/FIOCRUZ, onde foi registrada a chegada e os boletins de amostragem preenchidos pelos Agentes de Controle de Endemias no momento da coleta (Anexo III) foram armazenados e as populações rotuladas com um código conhecido apenas pelo diretor do estudo, a fim de manter a confidencialidade de sua origem. Metade das populações permaneceu no LAFICAVE e a outra metade foi enviada ao LEnA. A identificação de espécimes de *Ae. aegypti*, manutenção de colônias e condução de bioensaios foram realizados por esses dois laboratórios: LAFICAVE e LEnA.

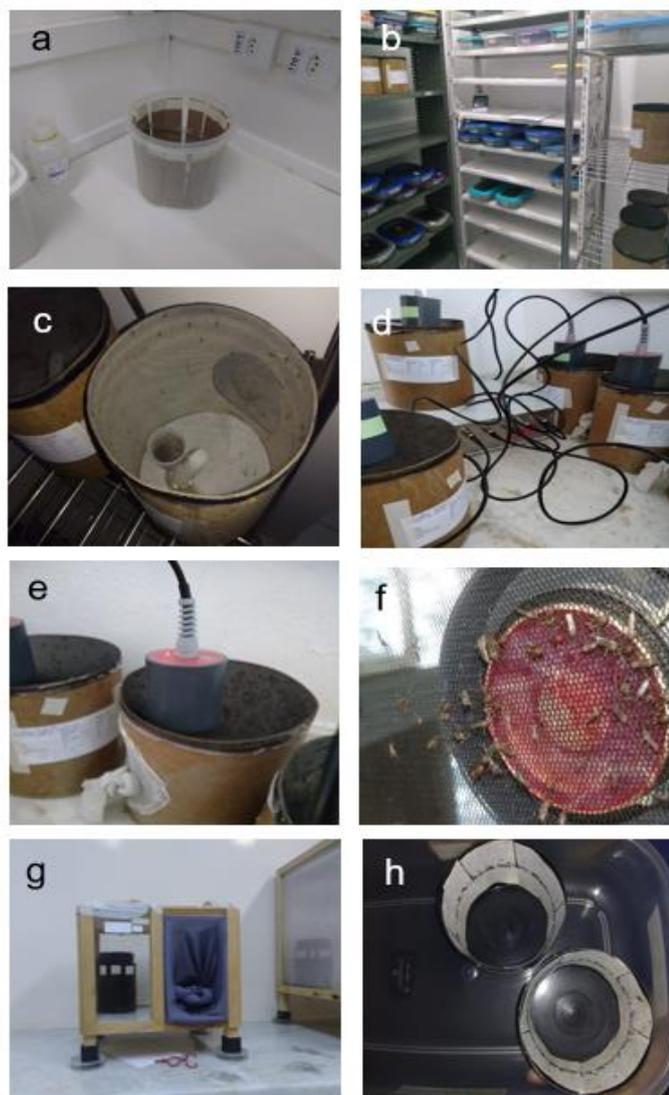
Minha participação neste projeto se deu por meio da execução de atividades de coordenação e acompanhamento das ações, que incluíram: elaboração do projeto juntamente com o PhD. José Bento Pereira Lima (LAFICAVE); iniciação e formalização do mesmo junto ao MS; identificação dos representantes dos Programas de Controle do *Aedes* e dos Laboratórios de Entomologia nas Secretarias Estaduais de Saúde e contato constante com os mesmos para acompanhamento e orientações; realização, juntamente com a equipe do LAFICAVE, de reunião com os representantes estaduais para apresentação do projeto, material de treinamento e planejamento das atividades; monitoramento dos relatórios de resultados parciais e prestações de contas; elaboração de pareceres técnicos e outros documentos relacionados emitidos pelo Ministério da Saúde durante todas as suas fases.

#### 4.1.2. Criação de mosquitos em laboratório

Paletas com ovos foram imersas em água desclorada e as larvas eclodidas foram transferidas para bacias contendo 1 L de água desclorada e 100 mg de ração para peixes (TetraMin®, Tetra Marine Granules) adicionados a cada três dias (Fig. 7 a,b). Foram levadas para criação um número máximo de 5000 larvas por população de campo, sendo descartadas aquelas em número excedente. Os mosquitos adultos resultantes foram identificados por espécie e gênero, separando 500 fêmeas e 500 machos *Ae. aegypti* para serem mantidos em gaiolas (33 x 24 x 8 cm), onde uma solução de sacarose a 10% foi oferecida *ad libitum* (Fig. 7 c). Quando o número de fêmeas era insuficiente para produzir uma geração F1 (menos de 100 fêmeas), novas coletas de campo eram solicitadas.

Para produzir ovos para a próxima geração, as fêmeas F0 foram adicionalmente alimentadas com sangue usando cobaias (*Cavia porcellus* - Linnaeus, 1758) três dias após a emergência (autorizações do Comitê de Ética em Uso de Animais da FIOCRUZ LW-20/14 e L-004/2018). Alternativamente, foi oferecido às fêmeas que se alimentassem de sangue de coelho citratado através do alimentador de membranas Hemotek (Discovery Workshops, Accrington, Reino Unido), contendo 6 mL de sangue coberto com uma membrana de tripa de porco ou carneiro, selada com um anel de borracha, a 37 °C por 1 hora (Fig. 7 d,e,f).

Mosquitos da geração F1 eram geralmente empregados nos bioensaios, no entanto, era necessária uma geração F2 sempre que o número de indivíduos da geração F1 era insuficiente para realizar todos os ensaios com larvas e adultos. Para cada população, foram necessárias no mínimo 960 larvas para as quatro repetições dos ensaios de dose-resposta, e 1.760 larvas para as quatro repetições dos ensaios DD, respectivamente. Além disso, foram necessárias 1.000 fêmeas adultas para realizar quatro repetições dos testes de suscetibilidade ao malathion.



**Figura 7.** Criação de mosquitos *Aedes aegypti* em laboratório. (a) Imersão das paletas para eclosão das larvas, (b) criação das larvas eclodidas em bacias, (c) alimentação de mosquitos adultos com solução de sacarose a 10%, (d, e, f) alimentação de fêmeas com sangue de coelho citratado através do alimentador artificial Hemotek (Discovery Workshops, Accrington, Reino Unido), (g) manutenção dos mosquitos em gaiola para a cópula, (h) ovos da próxima geração da espécie *Ae. aegypti*. Os insetos foram mantidos sob controle de temperatura ( $26 \pm 2$  °C) e umidade ( $70 \pm 10\%$ ), seguindo o manual de biossegurança da Fiocruz para inseticidas e insetos vetores (Adegas et al., 2005).

A linhagem Rockefeller (Kuno, 2010) referência para suscetibilidade e vigor a inseticidas em condições de laboratório, foi empregada para determinação de doses diagnósticas (DD) a serem utilizadas nos bioensaios, e foi exposta em paralelo, em cada ensaio, como controle de qualidade. Para testes biológicos com adultos e larvas, a padronização foi realizada usando esta cepa suscetível.

### 4.1.3. Bioensaios de avaliação da resistência (2017 – 2018)

#### 4.1.3.1. Estimativa das doses diagnósticas

*Estimativa de DD em bioensaios* - Antes da avaliação da suscetibilidade de populações de campo de *Ae. aegypti*, foi necessário estimar a DD para PPF e malathion, respectivamente em larvas e adultos, sob as condições locais. As DDs estabelecidas localmente foram obtidas por ensaios de dose-resposta com a linhagem Rockefeller. A colônia Rockefeller mantida no LEnA foi usada para os testes em ambos os laboratórios.

*Estimativa da DD para piriproxifeno* - Os bioensaios larvais foram conduzidos com o IGR PPF padrão analítico (Sigma Pestanal®), pré-dissolvidos em acetona (Sigma Aldrich®) e posteriormente diluídos em etanol (Merck®). Seguindo os procedimentos descritos nas Diretrizes da OMS para bioensaios de larvicidas com poucas modificações (WHO, 2016a), as larvas do terceiro estágio (estádio L3) foram submetidas a um gradiente de 13 concentrações do produto (0,0667 a 0,2337 µg/L), a partir das quais a porcentagem da inibição da emergência de adultos (IE) foi avaliada no final de 7 a 10 dias, quando todas as larvas do controle emergiram em adultos. Quatro réplicas, com 10 larvas em estágio L3 cada, foram preparadas para cada concentração e um número igual de controles foi preparado usando apenas etanol. As larvas foram alimentadas com 10 mg de ração para peixes (TetraMin®, Tetra Marine Granules) no primeiro dia e 5 mg no terceiro dia após a exposição inicial das larvas. Os ensaios foram lidos diariamente até a emergência completa dos adultos no grupo controle.

Um ensaio seria descartado se o IE do grupo controle fosse > 10%, caso contrário, corrigido pela fórmula de Abbott quando houvesse algum IE entre 5% e 10% (WHO, 2016a). Quatro testes foram realizados em momentos diferentes. Quando as pupas começaram a surgir, os copos foram cobertos com uma malha para evitar eventuais fugas de adultos. A mortalidade e o surgimento de adultos foram registrados quando todos os espécimes em condição de controle emergiram como adultos. Consideramos adultos vivos aqueles totalmente livres de suas exúvias e capazes de voar quando tocados suavemente. O percentual

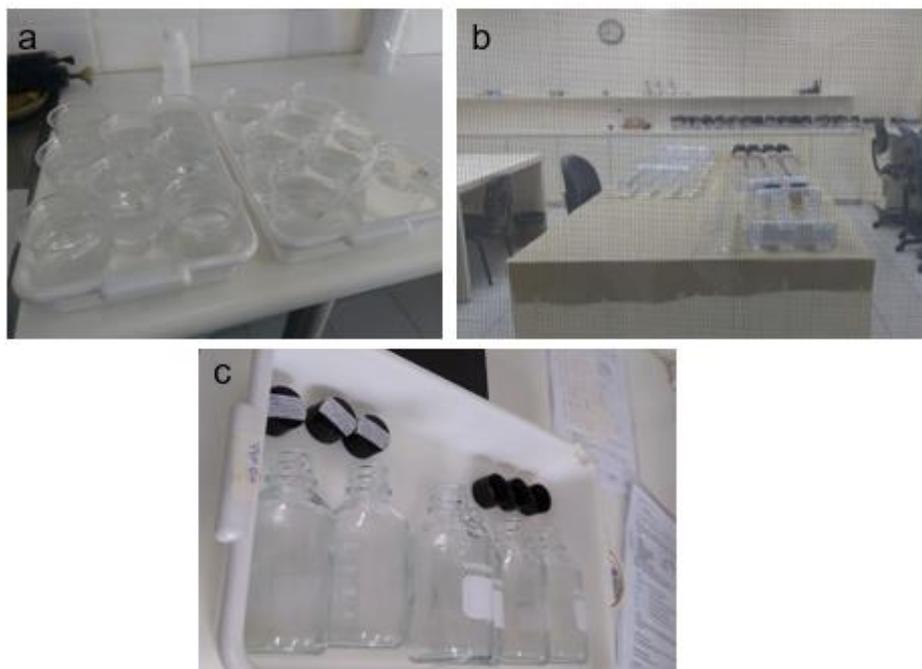
de inibição de emergência de adultos (IE) foi calculada usando Probit (Polo-PC, LeOra Software, Berkeley, CA) e análise de regressão logística (Raymond, 1985). Finalmente, a DD do PPF foi determinada como o dobro da dose que inibia a emergência de adultos em 99% (IE<sub>99</sub>) das larvas de Rockefeller expostas ao composto.

*Estimativa da DD para malathion* - Para a realização dos bioensaios, foram preparadas alíquotas de soluções de estoque do OP a uma concentração de 3000 mg/L a partir do malathion padrão analítico (Sigma Pestanal®) e solvente acetona (Sigma Aldrich®) e armazenadas no freezer a -80 °C. Garrafas de vidro de 250 mL (Wheaton) foram impregnadas com 1 mL de malathion dissolvido em solução de acetona, em quatro concentrações (12, 15, 18 e 20 µg/garrafa) preparadas a partir da solução estoque 24 h antes do teste. Foram utilizadas duas garrafas por concentração e um controle (impregnado apenas com 1 mL de acetona) para cada teste, cada garrafa contendo 25 fêmeas com 3 a 5 dias de idade. Foram realizados seis testes com cada dose, em dias distintos. Os mosquitos foram expostos ao inseticida por até 30 minutos, com mortalidade registrada a cada 10 minutos. A dose que causou 100% de mortalidade em 30 minutos, tempo recomendado pela OMS, foi considerada a DD (WHO, 2016a). Os testes de DD com populações de campo consistiram em 25 fêmeas com 3 a 5 dias de idade sopradas suavemente com um aspirador de Castro dentro das garrafas: quatro garrafas impregnadas com a DD do malathion e dois controles contendo apenas acetona. Testes adicionais foram conduzidos com a DD recomendada pela OMS (50 µg/garrafa) (WHO, 2016b). Foram realizados três ensaios independentes para cada população e com as DDs determinadas pelo laboratório e as recomendadas pela OMS.

#### **4.1.3.2. Avaliação da suscetibilidade ao piriproxifeno (2017 – 2018)**

*Primeira triagem com DD* - Uma vez obtida a DD do PPF, larvas da população de campo (16 réplicas de 10 larvas, total de 160 larvas) foram expostas à DD do IGR, além de 80 larvas (8 réplicas de 10 larvas) como controle negativo (apenas etanol). Paralelamente, 80 larvas de Rockefeller (8 réplicas de 10 larvas) também

foram expostas à DD, como controle interno de qualidade do ensaio. As soluções de IGRs foram preparadas a partir do padrão analítico de PPF (Sigma Pestanal®) pré-dissolvido em acetona (Sigma Aldrich®) e posteriormente diluídas em etanol (Merck®). Alíquotas contendo 15 µL de IGR a uma concentração de 100.000 mg/L foram preparadas e armazenadas no freezer a -80 °C. Essas alíquotas foram usadas para preparar soluções-estoque de 5 mL na concentração de 300 mg/L e armazenadas na geladeira por 30 dias. A partir dessas soluções estoque, uma nova diluição foi preparada no mesmo dia dos testes, em uma concentração final a partir da qual 1 mL resultaria na DD desejada nos copos de teste de 250 mL (Fig. 8 a, b). Cada população foi testada em quatro dias diferentes. O resultado de IE de cada população foi obtido pela média desses quatro ensaios. Adaptamos os critérios da OMS para classificar as populações como suscetíveis, quando seu IE% foi maior ou igual a 98, com resistência sugerida quando esse percentual ficou entre 90 e 97,9, ou resistentes nos casos em que IE foi menor que 90% (WHO, 2016a).



**Figura 8.** Ensaio para avaliação da suscetibilidade de populações de *Aedes aegypti* ao PPF e ao malathion. (a, b) preparo dos copos para exposição das larvas à DD do PPF ou ao controle com etanol, (c) garrafas impregnadas para exposição de fêmeas adultas à DD de malthion ou ao controle com acetona.

*Estimativa da razão de resistência* - As populações de campo não suscetíveis ao PPF (IE <98%) nos ensaios de DD foram submetidas a um ensaio de dose-resposta para quantificar seus níveis de resistência, seguindo os procedimentos acima para a obtenção de DD. As larvas foram expostas a uma faixa de 10 concentrações (0,008–0,45 µg/L) em quatro repetições, com 10 larvas L3 cada, quatro repetições de controles usando apenas etanol. Rockefeller foi executada em paralelo, em 4 repetições, com larvas expostas apenas à DD. As mortalidades foram registradas até a emergência de todos os adultos na condição de controle.

A inibição de emergência das concentrações em adultos de 50% e 95% (IE<sub>50</sub> e IE<sub>95</sub>) de cada população foi obtida pela análise Probit (Finney, 1971). As razões de resistência foram obtidas dividindo-se o IE<sub>50</sub> e IE<sub>95</sub> de cada população pelo IE equivalente da linhagem Rockefeller de referência. As populações foram classificadas como sugerido por Mazzari e Georghiou (1995) com resistência baixa, moderada ou alta, respectivamente, para RR<sub>95</sub> <5, entre 5,0 e 10,0 e >10,0.

#### **4.1.3.3. Avaliação da suscetibilidade ao malathion (2017 – 2018)**

As populações de campo de *Ae. aegypti* foram testadas usando fêmeas adultas, três a cinco dias após a emergência e não alimentadas com sangue, das gerações F1 ou F2. Cada teste consistiu na exposição de grupos de 20 a 25 fêmeas por garrafa, com quatro garrafas impregnadas com cada DD (20 µg/garrafa e 50 µg/garrafa) além de duas garrafas impregnadas apenas com acetona e utilizadas como controle negativo (Fig. 8 c). Rockefeller foi usada em paralelo com duas garrafas impregnadas com cada DD. Os registros de mortalidade eram coletados a cada 15 minutos e os mosquitos que não conseguiam voar ou se manter de pé eram considerados mortos. A mortalidade das réplicas de cada DD foi calculada no tempo de diagnóstico (30 min.) em cada ensaio. Foram realizados quatro bioensaios para cada população, enquanto o resultado final considerou a mortalidade média.

Os ensaios de dose diagnóstica e dose-resposta para os compostos IGR e adulticida foram realizados nas condições de insetário de testes, com controle de temperatura ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade (60-80%).

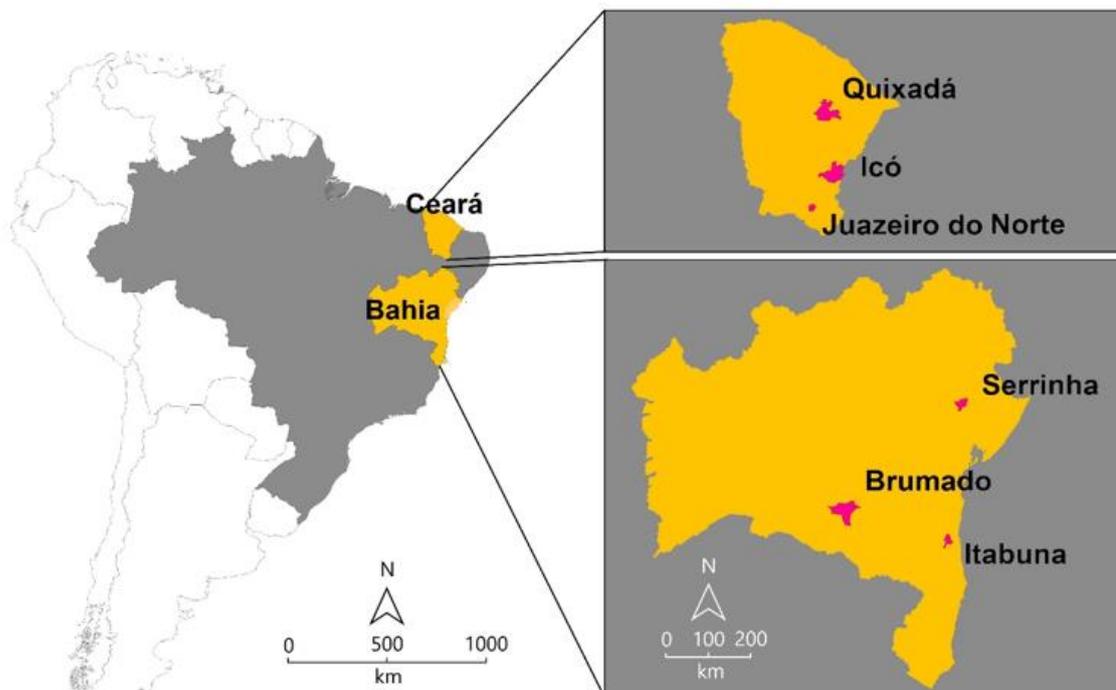
#### **4.1.4. Análise de dados (2017 - 2018)**

O percentual de inibição da emergência de adultos, as concentrações letais de dose-resposta (CL), seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) e o *slope* das populações foram calculadas pelo software Polo-PC, empregando uma análise Probit (Finney, 1971). As Razões de Resistência (RR) foram obtidas pelo quociente entre a CL de uma população e o da Rockefeller. Os mapas foram construídos com os softwares QGIZ versão 2.18.6 e GIMP versão 2.10.14 (Raymond, 1985).

## **4.2. Avaliação da suscetibilidade de populações de campo de *Ae. aegypti* ao PPF em 2020**

### **4.2.1. Populações de estudo avaliadas em 2020 e método de coleta**

A coleta de populações de campo de *Ae. aegypti* ocorreu em municípios onde a resistência ao PPF foi detectada em estudo anterior, dois anos após a avaliação inicial. Essas populações foram derivadas de seis cidades localizadas nos estados Ceará (Quixadá, Icó e Juazeiro do Norte) e Bahia (Itabuna, Brumado e Serrinha), na região Nordeste do Brasil (Figura 9).



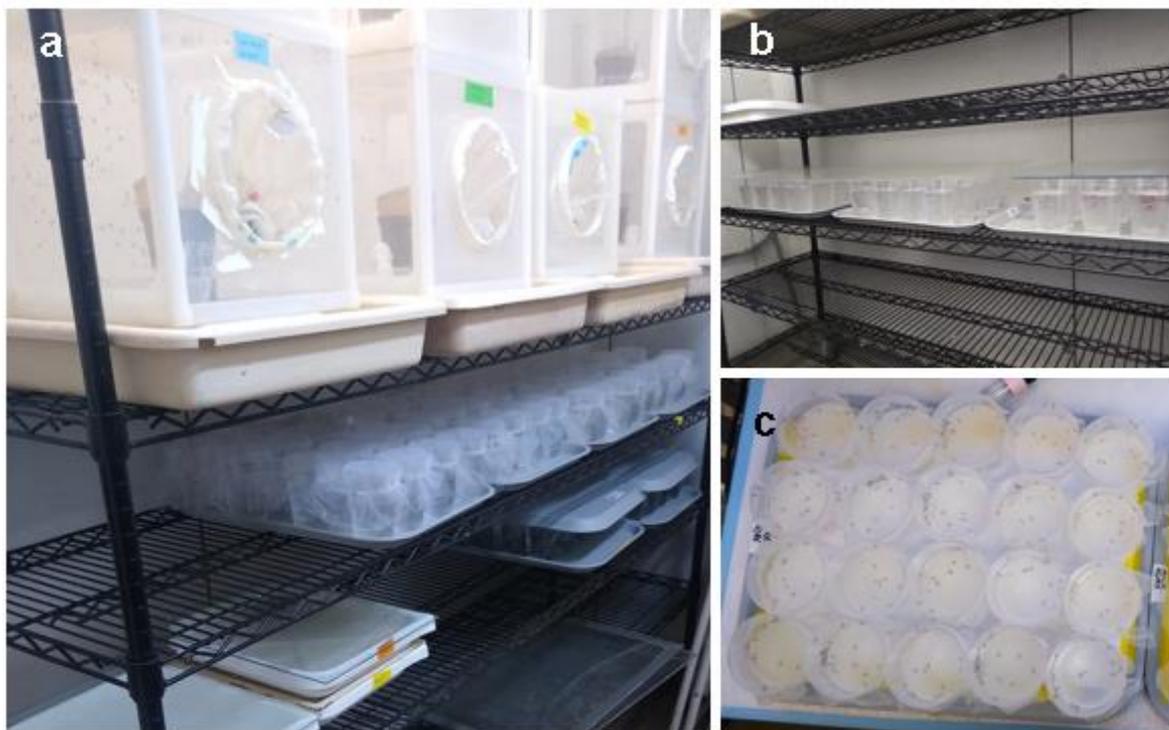
**Figura 9.** Mapa do Brasil mostrando as localizações geográficas onde mosquitos foram amostrados nos estados do Ceará e da Bahia, em 2020.

Ovos de *Ae. aegypti* foram coletados em fevereiro e março de 2020 pelos Agentes de Controle de Endemias (ACEs) de cada município, utilizando cerca de 100 armadilhas de oviposição (ovitrapas) naqueles com até 50.000 imóveis e 150 ovitrapas naqueles com até 200.000 imóveis, seguindo a metodologia da Rede MoReNAa (Lima et al., 2003, Braga & Valle, 2007). Para instalar as armadilhas, os imóveis foram selecionados respeitando-se uma distribuição uniforme em padrão de grade e cobertura completa do território urbano, incluindo regiões que apresentavam diferentes níveis de infestação. Os ACEs instalaram uma armadilha em uma área sombreada no terreno de cada imóvel selecionado. Cada ovitrapa foi preenchida com 300 ml de água de torneira, 1 ml de solução de extrato de levedura (0,04%) como atrativo para fêmeas grávidas e uma única paleta de madeira como substrato para oviposição. As ovitrapas foram mantidas nos domicílios por 15 dias, as paletas e soluções atraentes foram trocadas ao final da primeira semana. As paletas contendo os ovos foram secas ao ar por dois a três dias antes de serem enviadas para o Laboratório de Fisiologia e Controle de

Artrópodes Vetoriais (Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, LAFICAVE), no Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), Rio de Janeiro/RJ.

#### 4.2.2. Criação de mosquitos em laboratório

As paletas contendo ovos foram submersas em água desclorada. Depois da eclosão dos ovos, as larvas foram transferidas para bacias (33 × 24 × 8 cm) contendo 1 litro de água e 100 mg de ração para peixes (TetraMin® Tropical Granules, Grânulos Tetra Marine; Tetra GmbH, Melle, Alemanha), com alimentação suplementar adicionada a cada três dias (Fig. 10 a). Dez bacias com 500 larvas de cada população foram usadas para estabelecer as colônias de mosquitos. Em alguns casos, menos de 500 larvas estavam disponíveis e, portanto, todas as larvas disponíveis foram usadas para estabelecer a colônia. Pupas de populações de campo foram coletadas e colocadas em tubos com rolhas de algodão para permitir a captura de adultos recém-emergidos e a identificação de espécies. Os mosquitos *Ae. aegypti* adultos foram mantidos em gaiolas plásticas (30 X 30 X 30 cm) com acesso a uma solução de sacarose a 10% através de mechas de algodão (Fig. 10 a). Para produzir ovos para a próxima geração, oferecemos para as fêmeas refeições de sangue (sangue de coelho) contendo citrato de sódio como anticoagulante, através de alimentadores de membrana Hemotek (Discovery Workshops, Accrington, Reino Unido) a 37° C por 1 h. As colônias de mosquitos foram mantidas a  $26 \pm 2^\circ$  C de temperatura e  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa. A colônia de *Ae. aegypti* Rockefeller foi usada como controle experimental e uma cepa conhecida por ser suscetível a inseticidas (Kuno, 2010). Esta linhagem de referência foi usada para determinar a razão de resistência (RR).



**Figura 10.** Criação de populações de mosquitos *Aedes aegypti* no Laboratório de Entomologia Médica da Flórida, e condução de bioensaios de resistência ao piriproxifeno. (a) criação de larvas de mosquitos em bacias, e manutenção de adultos em gaiolas plásticas; (a, b, c) condução de bioensaios de resistência dos mosquitos ao piriproxifeno, por meio da exposição de larvas a diferentes concentrações do produto em copos plásticos.

#### **4.2.3. Preparação de piriproxifeno, bioensaios de toxicidade e estimativa da razão de resistência (2020)**

O padrão analítico de PPF (Sigma-Aldrich, Co., St Louis, EUA) foi dissolvido em acetona e posteriormente diluído em série em etanol para preparar diferentes concentrações para os bioensaios de toxicidade (Campos et al., 2020). Os bioensaios do tipo dose resposta (DR) foram conduzidos no Laboratório de Entomologia Médica da Flórida (FMEL) em Vero Beach, FL. Ovos de populações de campo (geração F3) foram enviados para FMEL após receber uma autorização de exportação pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (Anexo VII). Usamos a geração F4 para os bioensaios devido ao atraso na realização de experimentos resultantes da pandemia de COVID-19.

Os mosquitos foram criados para a obtenção da próxima geração (F4) em condições semelhantes às mencionadas anteriormente, antes de serem submetidos aos bioensaios de toxicidade. Seis populações de campo e uma cepa de *Ae. aegypti* suscetível a inseticidas (Rockefeller) foram submetidas a bioensaios de DR para quantificar seus níveis de resistência, seguindo os procedimentos descritos nas diretrizes da OMS para bioensaios de larvicidas (Fig. 10 a, b, c).

Resumidamente, quarenta larvas de 3<sup>o</sup> ou 4<sup>o</sup> instares (quatro repetições com dez larvas cada) foram expostos a dez concentrações, variando de 0,0008 a 0,05 µg/L. Quatro testes foram realizados em momentos diferentes. Alimento larval (10 mg) foi adicionado aos copos no dia inicial da exposição durante os bioensaios, e 5 mg de alimento suplementar dois dias depois. Os percentuais de inibição de emergência de adultos (IE) foram calculados ao final dos bioensaios, quando todas as pupas do controle emergiram em adultos (expresso como uma porcentagem da coorte original de mosquitos). Os adultos foram considerados como tendo sobrevivido se estavam livres da exúvia pupal e capazes de voar quando tocados suavemente.

#### **4.2.4. Análise de dados (2020)**

Os Percentuais de inibição da emergência de 50% e 90% dos adultos (IE<sub>50</sub> e IE<sub>90</sub>) de cada população foram determinados usando análise Probit (SAS versão 9.22, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA.). A mortalidade foi corrigida pela fórmula de Abbot, quando necessário. As razões de resistência (RR<sub>50</sub>) foram obtidas dividindo o IE<sub>50</sub> de cada população de mosquitos pelo equivalente IE da cepa de referência Rockefeller. Os níveis de resistência foram classificados como baixo (<5), moderado (5,0–10,0) ou alto (>10,0) (Mazzari & Georghiou, 1995).

### **4.3. Suscetibilidade de populações de *Ae. aegypti* resistentes ao piriproxifeno à infecção pelo vírus Zika**

#### **4.3.1. Aspectos éticos**

Experimentos de infecção de mosquitos por ZIKV foram realizados no Laboratório de Entomologia Médica da Universidade da Flórida (instituição de pesquisa em arbovirologia com nível de biossegurança-2 e nível de contenção de artrópodes-2), de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Biossegurança Institucional e pelo Comitê de Cuidado e Uso de Animais da Universidade da Flórida.

#### **4.3.2. Populações de mosquitos**

As populações do mosquito *Aedes aegypti* foram coletadas em fevereiro e março de 2020 em diferentes cidades localizadas no Nordeste do Brasil (Serrinha, Brumado e Itabuna, na Bahia; Juazeiro do Norte e Quixadá, no Ceará) (Fig. 11) usando em torno de 100 armadilhas de oviposição (ovitrapas) em municípios com até 50.000 domicílios e 150 ovitrapas em municípios com até 200.000 domicílios, seguindo a metodologia da Rede MoReNAa (Lima et al., 2003; Braga & Valle, 2007). Essas ovitrapas contendo água da torneira, solução de extrato de levedura (0,04%) e uma paleta de madeira (Eucatex) foram distribuídas por 15 dias no terreno das casas selecionadas, seguindo uma distribuição uniforme que abrangeu a totalidade do território urbano, para incluir regiões com diferentes níveis de infestação.

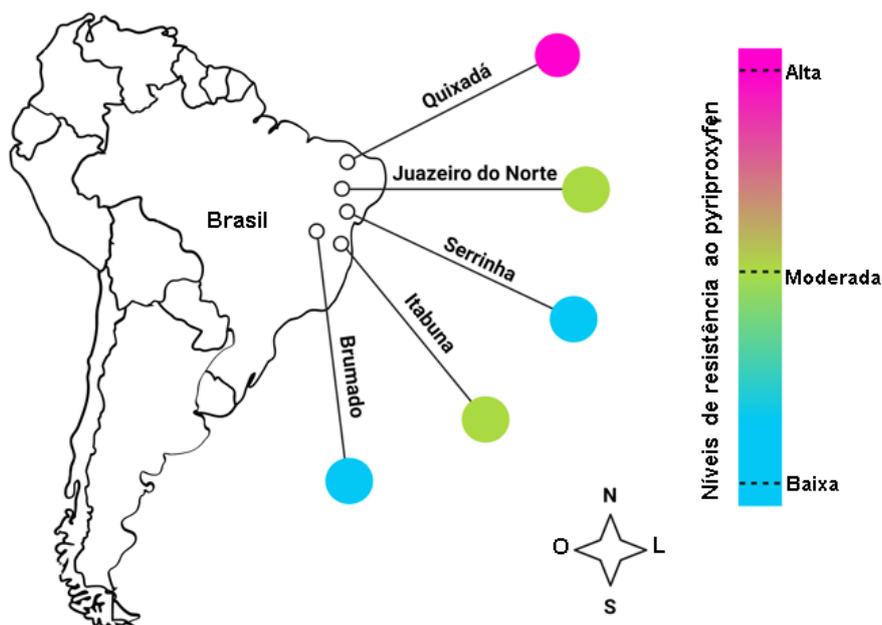
Ovos de geração parental coletados em campo foram eclodidos e utilizados para estabelecer colônias de laboratório de cada população, que foram mantidas no Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, LAFICAVE, do Instituto Oswaldo Cruz. IOC/Fiocruz), Rio de Janeiro/RJ antes de serem enviados ao Laboratório de Entomologia Médica da Universidade da Flórida (FMEL/UF), Vero Beach.

Os mosquitos foram mantidos em um insetário a 26–28 °C, umidade relativa de 70–80% e ciclo claro-escuro de 12: 12 h. As larvas foram eclodidas

em água desoxigenada preparada em um recipiente isolado a vácuo acionado por uma bomba eletrônica por 45 min, e as larvas recém eclodidas foram criadas em bandejas com água destilada (1,5 L) e alimentadas com ração para peixes (TetraMin). As pupas foram transferidas para gaiolas de criação de adultos, onde os adultos emergentes foram mantidos com uma dieta de solução de sacarose a 10%.

Para gerar ovos, as fêmeas adultas foram alimentadas com sangue em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de acordo com as políticas de uso e cuidados de animais do Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais da Universidade da Flórida - IACUC (Protocolo 202007682). Os ovos recém-postos foram coletados e secos ao ar antes de serem armazenados em temperatura ambiente em recipientes plásticos.

Os bioensaios larvários foram realizados em todas as populações de campo e em uma população reconhecidamente suscetível (Rockefeller), para determinar seus níveis de resistência ao PPF, seguindo os procedimentos descritos nas diretrizes da OMS para bioensaios de resistência a larvicidas (WHO, 2016c). Os resultados dos bioensaios realizados em 2017 e 2018, seguindo os mesmos procedimentos, revelaram baixas taxas de resistência ao PPF para todas essas seis populações de campo (Serrinha, Brumado, Juazeiro do Norte, Itabuna e Quixadá).



**Figura 11.** Mapa do Brasil mostrando as cidades onde populações de *Aedes aegypti* foram coletadas com seus níveis relativos de resistência ao PPF.

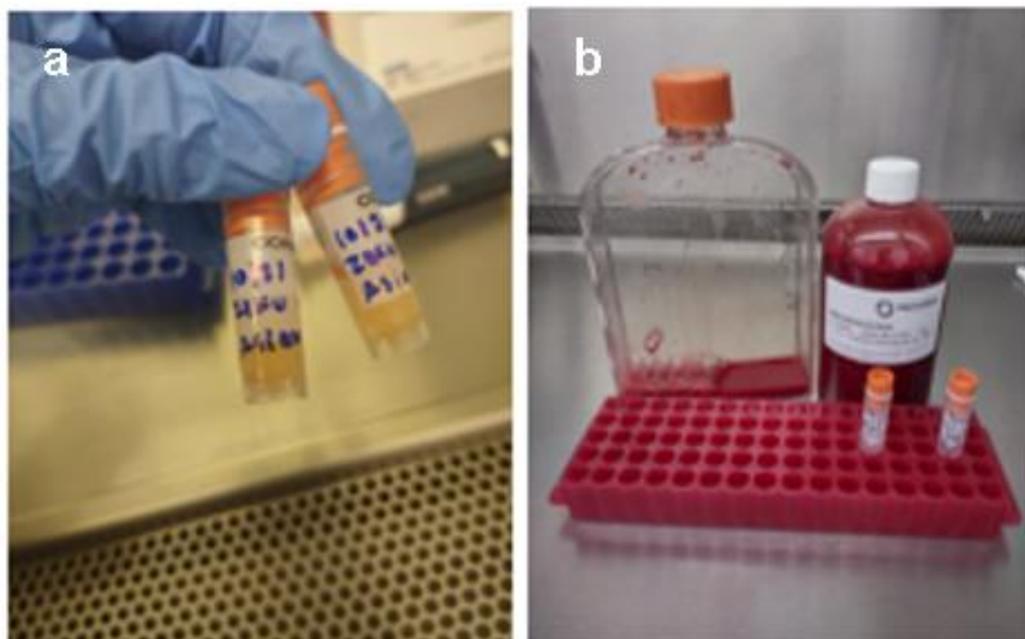
#### 4.3.3. Zika vírus e células

O isolado da linhagem asiática de ZIKV (estirpe Porto Rico, PRVABC59) usado neste estudo foi coletado do soro de um humano infectado por ZIKV que viajou para Porto Rico em 2015 e nos foi fornecido pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (Fig. 12 a). O ZIKV foi passado três vezes em cultura de células antes de usar no estudo. A sequência completa do genoma desta cepa de vírus pode ser encontrada sob o número de acesso ao banco de genes KU501215.1.

A propagação do ZIKV foi realizada conforme descrito por Alomar e colaboradores (2021) e no protocolo para replicação de células Vero, propagação e titulação viral (ensaio de placa) (Anexo VIII). Resumidamente, células de macaco verde africano (Vero) foram deixadas crescer em frascos de cultura de células T-175 cm<sup>2</sup> a 37 °C e 5% de atmosfera de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) até 80-90% de confluência. Monocamadas de células foram então infectadas com ZIKV estoque em uma multiplicidade de infecção de 0,01 e incubadas por seis dias a 37°C em meio (M<sub>199</sub>) (HyClone, Meio 199, GE Healthcare, Logan, UT) suplementado com soro bovino fetal a 10% de

concentração inativado pelo calor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), antibióticos (penicilina-estreptomicina) e micostatina.

Após este período de incubação, o sobrenadante da cultura de células infecciosas foi colhido e adicionado ao sangue bovino desfibrinado (Hemostat Laboratories, Dixon, CA) com adenosina-5'-trifosfato de sal dissódico tri-hidratado (ATP, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) para obter alimentação sanguínea infecciosa (Fig. 12 b) (Alomar & Alto, 2022; Alomar et al., 2022).



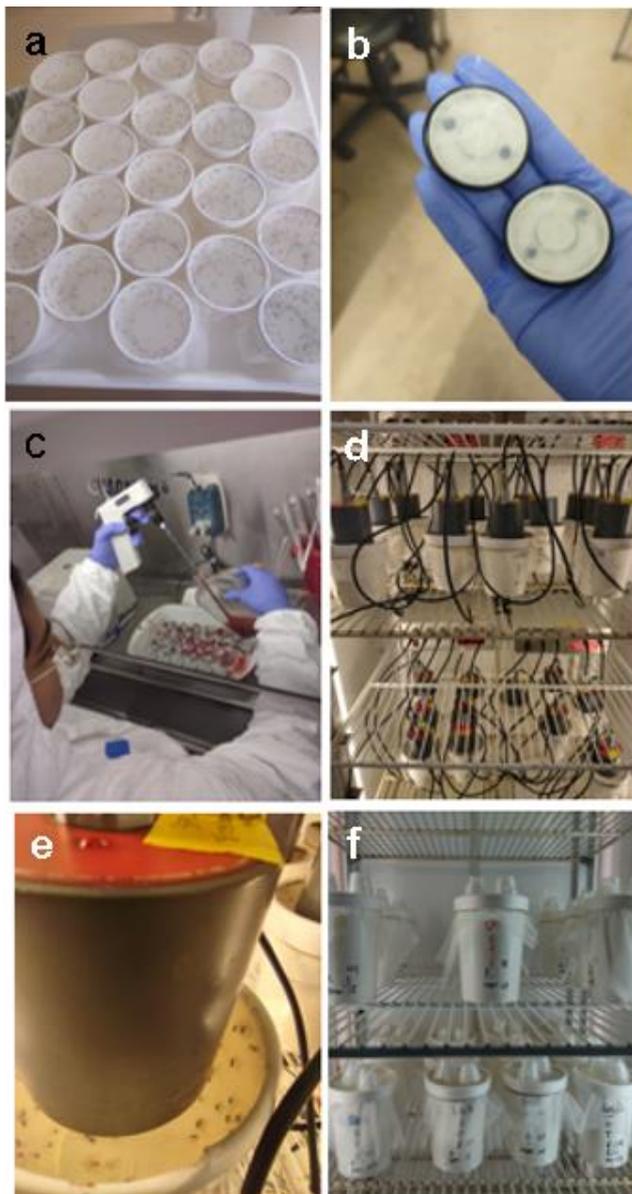
**Figura 12.** Preparo do sangue infectado para alimentação de fêmeas *Aedes aegypti*. (a) estoques da linhagem asiática de ZIKV, (b) alimentação sanguínea infecciosa preparada para infecção oral dos mosquitos (frasco T-175 à esquerda); sangue bovino desfibrinado (frasco à direita); frascos criogênicos contendo alíquotas de alimentação sanguínea coletadas imediatamente antes e após serem oferecidas aos mosquitos.

#### 4.3.4. Sangue infectado pelo vírus Zika e infecção oral

Mosquitos fêmeas com 5-8 dias de idade foram mantidos em copos de papelão (50 mosquitos/copo) e privados de solução de sacarose 24 h antes do

desafio de infecção oral em refeições de sangue virêmicas (Fig. 13 a). O sangue foi administrado através de alimentadores Hemotek (Discovery Workshops, Lancashire, Reino Unido) cobertos com intestino de ovelha como membrana, e aquecidos a 37°C. Os mosquitos foram alimentados por 45 minutos em estufa a 28°C (Fig. 13 b, c, d, e).

Antes e imediatamente após serem oferecidas às fêmeas, a alimentação sanguínea infecciosa foi alíquotada em frascos criogênicos, congelados a -80 °C, para posteriormente serem determinados os títulos virais alimentados pelos mosquitos por meio de ensaios (Fig. 13 b). Fêmeas totalmente ingurgitadas foram separadas daquelas parcialmente ou não alimentadas, após serem anestesiadas com dióxido de carbono, sendo em seguida transferidas para novos copos de papelão com acesso a solução de sacarose a 10% durante o período de incubação extrínseco (Fig. 13 f).



**Figura 13.** Alimentação das fêmeas de *Aedes aegypti* com sangue bovino infectado. (a) fêmeas de *Aedes aegypti* mantidas em copos aguardando infecção oral, (b) alimentadores Hemotek preparados com membrana de intestino de ovelha, (c) inserção de sangue bovino infectado nos alimentadores Hemotek, (d, e) mosquitos sendo alimentados por meio de Hemotek em estufa a 28°C, (f) fêmeas ingurgitadas após alimentação, transferidas para novos copos com acesso a solução de sacarose a 10%.

#### 4.3.5. Coleta de saliva por meio de papel catiônico (Cationic-Q-paper)

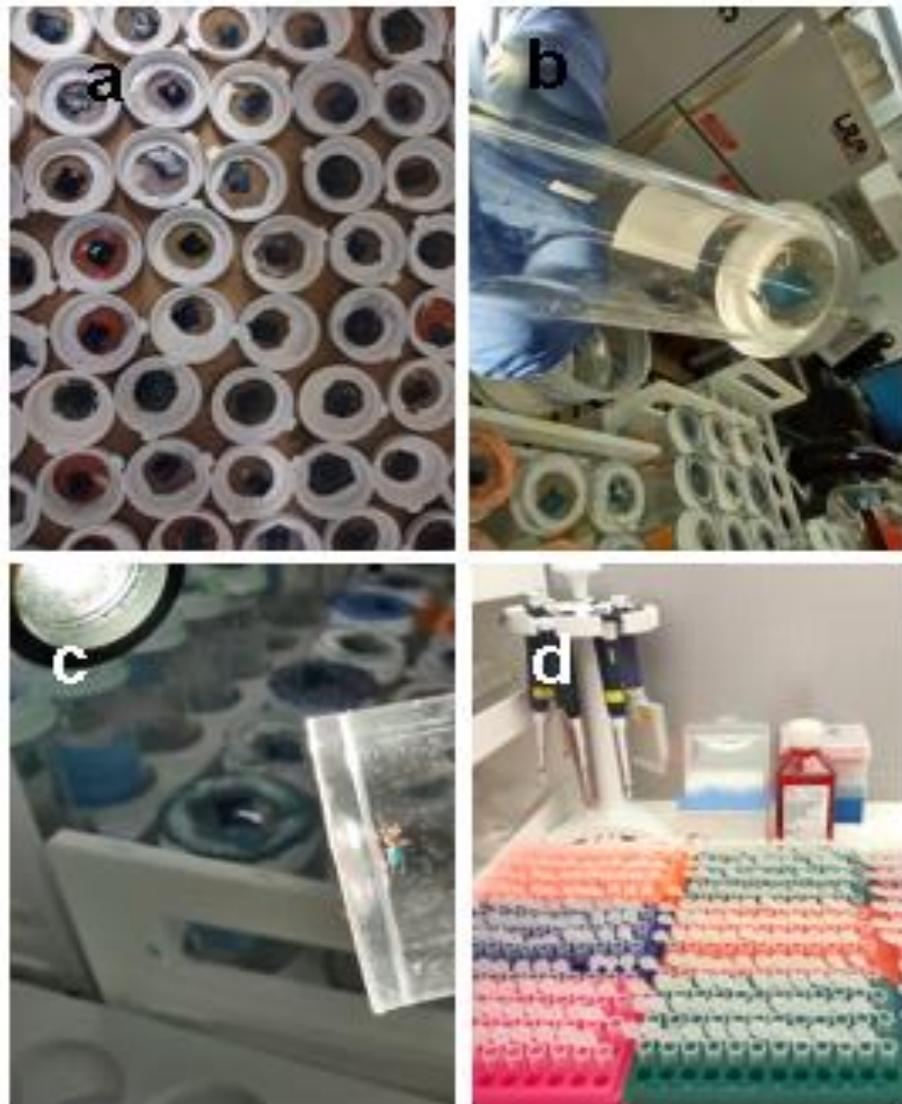
Para examinar a eficiência da transmissão viral, a saliva das fêmeas foi coletada usando a abordagem de papel catiônico à base de celulose [celulose-based cationic (Q) paper ou CQP, sigla na língua Inglesa], conforme descrito por

Alomar e colaboradores (2021). Por meio de interações eletrostáticas, o papel catiônico (carregado positivamente) adsorve os ácidos nucleicos (DNA e RNA), que são poliânions, depositados em sua superfície (Glushakova et al., 2018).

As fêmeas foram mantidas por um período de incubação de 14 dias após infecção oral, tendo acesso a solução de sacarose a 10% até 24 horas antes do procedimento de coleta de saliva, e com acesso a somente a água nas últimas 24 horas. Ao 15º dia, foram anestesiadas com dióxido de carbono e transferidas individualmente para frascos de cultivo de *Drosophila* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Os frascos haviam sido previamente preparados com CQPs de 1 cm X 1 cm, colocados em suas telas superiores para coletar a saliva depositada pelas fêmeas enquanto se alimentavam de mel, oferecido nos CQPs úmidos. Corante alimentar azul foi misturado ao mel como marcador visual para determinar as fêmeas que se alimentaram, uma vez que estas apresentavam abdome azul quando vistas sob uma fonte de luz (Fig. 14 a).

Os mosquitos foram mantidos nos frascos de cultivo e deixados para se alimentar dos CQPs contendo mel por 24 h (Fig. 14 b). As fêmeas alimentadas com sucesso, conforme indicado pela visualização da coloração azul em seus abdomens (Fig. 14 c), foram congeladas a -80 °C e posteriormente dissecadas para separar seus corpos das pernas. Cada amostra de mosquito (corpo, pernas, CQP) foi armazenada separadamente em tubos de micro centrífuga (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) contendo 1 ml de meio de cultura M199 e congelada a -80 °C até o processamento posterior (Fig. 14 d).

Os corpos das fêmeas alimentadas com sucesso em CQPs foram testados individualmente quanto à presença de ZIKV (Fig. 14 e). A presença do vírus foi testada nas pernas das fêmeas que apresentaram detecção viral em seus corpos, e em seguida testou-se a saliva daquelas que apresentaram ZIKV em suas pernas. O estudo de competência vetorial foi realizado com três réplicas biológicas.



**Figura 14.** Coleta de saliva de mosquitos *Aedes aegypti* por meio de papel catiônico à base de celulose. (a) papéis catiônicos [celulose-based cationic (Q) papers ou CQPs, sigla na língua Inglesa] úmidos tratados com mel e corante azul, colocados na tela da parte superior dos frascos de cultivo de *Drosophila*, (b) mosquito dentro do frasco se alimentando de mel no CQP, (c) visualização da coloração azul no abdômen de fêmea *Aedes aegypti* (a coloração aparentemente amarronzada do corpo do mosquito se deve à iluminação pela lanterna), (d) tubos de micro centrífuga e meio de cultura M199 para armazenamento das amostras (patas, corpos e papéis catiônicos) a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.3.6. Extração de ácido ribonucleico e PCR em tempo real para quantificação do vírus Zika**

O RNA viral foi extraído dos corpos, pernas e CQPs do mosquito congelados usando o Mini Kit de RNA Viral QIAamp (Qiagen, Germantown, MD, EUA), após homogeneização das amostras com esferas de aço em um TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Alemanha) a 19,5 Hz por 3 min e centrifugação a 13.200 rpm por 5 min, segundo Protocolo de extração de RNA e PCR (Mosquito e Vírus) em diluente BA-1 (QIAamp Viral RNA Mini Handbook), apresentado no Anexo IX.

O RNA do vírus Zika foi detectado e quantificado pelo sistema quantitativo de PCR em tempo real CFX96 (qRT-PCR) (BioRad Laboratories, Hercules, CA). As sequências de primers utilizadas foram F: 5'-CTTCTTATCCACACCGTCTC-3' e R: 5'-CCAGGCTTCAACGTCGTTAT-3', com sequência de sonda: 5'-/56 FAM/AGAAGGAGACGAGATGCGGTACAGG/3BHQ\_1/-3'. As reações foram realizadas usando o Sistema SuperScript III One-Step RT-PCR com Platinum Taq Polimerase (Invitrogen). As condições do qRT-PCR foram 94°C por 2 min, e 39 ciclos de 94°C por 15 s, 50°C por 30 min e 58°C por 1 min.

Os títulos de vírus em tecidos de mosquito e saliva foram quantificados usando uma curva padrão que compara a síntese de cDNA a diluições em série de ZIKV em paralelo com ensaios de placas das mesmas diluições do vírus, expressos como equivalentes de unidades formadoras de placa (PFUe)/mL. Para considerar uma amostra positiva para ZIKA nos ensaios de RT-PCR, considerou-se o valor de limite de ciclo um valor de Cycle Threshold (quantificação do DNA das amostras no qRT-PCR, sigla Ct) < 35 (Parker-Crockett et al., 2021).

A taxa de infecção foi calculada como a porcentagem de fêmeas infectadas (RNA viral detectado no corpo), em relação àquelas totalmente ingurgitadas. A taxa de disseminação foi a porcentagem de fêmeas com RNA viral nas pernas (indicando que o vírus superou as barreiras de escape do intestino médio), em relação às infectadas. Já a taxa de transmissão foi o percentual de fêmeas com vírus detectado na saliva (o que indica o vírus superou

as barreiras de transmissão das glândulas salivares), em relação àquelas com infecção disseminada.

#### **4.3.7. Análise estatística**

A suscetibilidade à infecção (número de corpos de mosquitos positivos/número total de mosquitos testados), infecção disseminada (número de pernas infectadas/número total de corpos infectados) e infecção por saliva (número de saliva positiva/número total de pernas infectadas) foram calculadas para cada população e analisados por meio de análise de regressão logística (PROC LOGISTIC, SAS 9.4). Efeitos de tratamento significativos foram examinados usando comparações de grupos de tratamento como testes de acompanhamento, corrigindo para comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer.

Os títulos virais em amostras de mosquitos foram testados para diferenças entre populações de mosquitos usando análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de intervalo de Tukey para comparações múltiplas. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Resultados dos ensaios de resistência os inseticidas realizados em 2017 – 2018

#### 5.1.1. Planejamento e execução da avaliação de resistência de *Ae. aegypti* aos inseticidas utilizados no seu controle (2017-2018)

Em 140 das 146 localidades selecionadas para o estudo (95,9%) os Agentes de Controle de Endemias conseguiram coletar material adequadamente e enviar ao laboratório. Ovos provenientes de 14 (9,6%) destes municípios, no entanto, não eclodiram ou o número de larvas resultantes foi insuficiente para produzir uma geração F1 (menos de 100 fêmeas) e, portanto, novas coletas foram solicitadas. Seis localidades enviaram novas amostras, possibilitando a criação de colônias de todas elas. As amostras coletadas nas localidades Parintins (Amazonas), Irecê (Bahia), Quixadá (Ceará) e Salgueiro (Pernambuco) permaneceram com número de fêmeas de *Ae. aegypti* menor que 100 após segunda coleta, entretanto foram produzidas gerações F1 com o número existente de fêmeas. No final, avaliamos 132 populações *Ae. aegypti* (94,3% dos pontos de amostragem inicialmente planejados). O número de mosquitos *Ae. aegypti* obtido por população variou de 48 a 2438 fêmeas e de 54 a 2563 machos. *Ae. albopictus* esteve presente em 59,8% (78/132) das populações, perfazendo 1 a 419 fêmeas e 1 a 455 machos.

#### 5.1.2. Coleta de ovos de *Ae. aegypti* em campo (2017- 2018)

A Tabela 3 apresenta as informações sobre as origens geográficas, número de paletas totais e positivas (com ovos), percentual de paletas positivas, número total de ovos, média de ovos por paletas positivas, total de adultos resultantes de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* coletadas entre agosto de 2017 e dezembro de 2018, no Brasil.

**Tabela 3.** Número de paletas, ovos e adultos de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* resultantes das coletas para avaliação de resistência, entre 2017 e 2018, no Brasil.

Nº	Região	Estado	Cidade	Mosquitos adultos <sup>a</sup>								
				paletas			ovos		<i>Ae. aegypti</i>		<i>Ae. albopictus</i>	
				total	positivas	% pp <sup>b</sup>	total	média por ppb	fêmeas	machos	fêmeas	machos
1	N	AC	Cruzeiro do Sul	196	72	36,7	5281	73,3	601	793	0	0
2	N	AC	Rio Branco	294	188	63,9	15747	83,8	2377	2533	0	0
3	N	AC	Brasília	100	43	43,0	2912	67,7	734	814	0	0
4	N	AM	Parintins	196	39	19,9	2709	69,5	90	54	96	91
5	N	AM	São Gabriel da Cachoeira	200	46	23,0	4680	101,7	423	383	0	0
6	N	AM	Humaitá	200	67	33,5	1933	28,9	696	690	0	0
7	N	AM	Tabatinga	172	50	29,1	3217	64,3	472	504	0	0
8	N	AM	Coarí	196	70	35,7	SI	SI	253	216	0	0
9	N	AM	Manaus	512	207	40,4	10092	48,8	1021	1047	187	98
10	N	AP	Macapá	265	79	29,8	2571	32,5	296	209	0	0
11	N	AP	Oiapoque	200	28	14,0	928	33,1	SI	SI	SI	SI
12	N	AP	Calçoene	74	14	18,9	634	45,3	207	178	0	0
13	N	PA	Santarém	302	87	28,8	3804	43,7	362	382	102	78
14	N	PA	Xinguara	202	35	17,3	3744	107,0	515	501	0	0
15	N	PA	Belém	600	361	60,2	19844	55,0	1751	1787	419	342
16	N	PA	Breves	202	26	12,9	2645	101,7	516	512	4	7
17	N	PA	Marabá	300	96	32,0	7394	77,0	503	500	0	1
18	N	PA	Altamira	304	103	33,9	6893	66,9	526	503	4	28
19	N	PA	Itaituba	200	102	51,0	9813	96,2	426	392	416	280
20	N	PA	Tucuruí	198	93	47,0	7384	79,4	504	501	219	158
21	N	PA	Redenção	200	29	14,5	2571	88,7	384	321	1	1
22	N	RO	Cacoal	196	52	26,5	1521	29,3	329	414	0	8
23	N	RO	Jaru	200	85	42,5	7.81	91,9	1843	1607	141	72
24	N	RO	Porto Velho	300	116	38,7	6269	54,0	1222	1042	257	167
25	N	RO	Guajará-Mirim	194	58	29,9	2575	44,4	1248	1374	0	0
26	N	RO	Vilhena	200	79	39,5	4513	57,1	1457	1583	0	0
27	N	RR	Rorainópolis	SI	39	SI	2124	54,5	352	198	0	0
28	N	RR	Boa Vista	300	166	55,3	13007	78,4	2293	2428	1	6
29	N	TO	Dianópolis	204	31	15,2	902	29,1	206	249	0	0
30	N	TO	Palmas	288	92	31,9	7152	77,7	578	262	12	32
31	N	TO	Gurupi	208	35	16,8	1054	30,1	240	251	0	0
32	N	TO	Araguaina	344	129	37,5	5893	45,7	501	500	1	1
33	NE	AL	Maceió	386	102	26,4	6212	60,9	496	395	41	20
34	NE	AL	Arapiraca	296	92	31,1	7382	80,2	1128	1007	0	0
35	NE	AL	Delmiro Gouveia	184	87	47,3	3287	37,8	523	309	0	0
36	NE	BA	Irecê	210	23	11,0	396	17,2	48	59	0	0
37	NE	BA	Salvador	878	327	37,2	21715	84,7	2264	2349	140	173
38	NE	BA	Teixeira de Freitas	220	83	37,7	4299	51,8	503	502	0	0
39	NE	BA	Itabuna	349	155	44,4	9828	63,4	505	606	0	2
40	NE	BA	Brumado	220	90	40,9	3904	43,4	289	322	1	1
41	NE	BA	Serrinha	204	99	48,5	4656	47,0	500	500	0	0
42	NE	CE	Fortaleza	696	269	38,6	18059	67,1	1491	1829	80	92
43	NE	CE	Sobral	300	97	32,3	6864	70,8	872	927	0	0
44	NE	CE	Crateús	100	SI	SI	4624	SI	871	1011	0	0
45	NE	CE	Quixadá	192	34	17,7	2527	74,3	76	64	0	0
46	NE	CE	Icó	200	131	65,5	9283	70,9	1919	1997	27	10
47	NE	CE	Juazeiro do Norte	300	138	46,0	24587	178,2	502	500	0	1
48	NE	PB	Sousa	200	63	31,5	1889	29,9	405	426	0	0
49	NE	PB	João Pessoa	388	239	61,6	12014	50,3	1756	1816	34	31
50	NE	PB	Campina Grande	300	91	30,3	3945	43,4	1007	1013	0	0
51	NE	PB	Alagoa Grande	200	88	44,0	2733	31,1	510	508	0	0
52	NE	PE	Recife	891	455	51,1	30080	66,1	731	730	87	68
53	NE	PE	Salgueiro	224	18	8,0	413	22,9	86	127	0	0
54	NE	PE	Garanhuns	219	47	21,5	1064	22,6	274	297	0	0
55	NE	PE	Petrolina	300	29	9,7	544	18,8	126	138	0	0
56	NE	PE	Palmares	198	90	45,5	6715	74,6	962	877	102	71
57	NE	PE	Araripina	SI	107	SI	5235	48,9	881	834	0	0
58	NE	PE	Santa Cruz do Capibaribe	303	144	47,5	10095	70,1	511	566	0	0
59	NE	PI	Florianópolis	190	56	29,5	1722	20,9	757	736	54	29
60	NE	PI	Teresina	414	125	30,2	5505	44,0	915	1034	360	273
61	NE	PI	Parnaíba	251	190	75,7	14090	78,3	1950	2191	77	63
62	NE	PI	Picos	100	29	29,0	1587	54,7	307	299	0	0
63	NE	PI	São Raimundo Nonato	100	23	23,0	462	20,1	165	191	0	0
64	NE	RN	Natal	400	277	69,3	18294	66,0	1761	1847	144	188
65	NE	RN	Pau dos Ferros	238	45	18,9	2660	59,1	806	854	0	0
66	NE	RN	Jardim do Seridó	100	62	62,0	4592	74,1	507	507	0	3
67	NE	RN	Mossoró	298	205	68,8	16114	78,6	2012	1858	0	0
68	NE	MA	São Luís	406	154	37,9	8925	58,0	1882	2148	152	102
69	NE	SE	Aracaju	416	196	47,1	15406	78,6	2438	2563	32	41
70	NE	SE	Nossa Senhora da Glória	214	84	39,3	7944	94,6	500	502	0	7
71	NE	SE	Itabaiana	324	139	42,9	6187	44,5	504	503	0	2
72	NE	SE	Lagarto	328	192	58,5	15021	78,2	508	500	0	2

Mosquitos adultos <sup>a</sup>												
Nº	Região	Estado	Cidade	paletas			ovos		<i>Ae. aegypti</i>		<i>Ae. albopictus</i>	
				total	positivas	% pp <sup>b</sup>	total	média por ppb	fêmeas	machos	fêmeas	machos
74	CO	GO	Minaçu	100	33	33,0	955	28,9	174	86	215	178
75	CO	GO	Posse	200	81	40,5	3693	45,6	564	535	237	203
76	CO	GO	Cristalina	SI	98	SI	5308	54,2	1003	930	0	0
77	CO	GO	<u>Goiânia</u>	604	222	36,8	12933	58,3	2211	2129	84	60
78	CO	GO	Iporá	200	133	66,5	10943	82,3	508	509	0	8
79	CO	GO	Jataí	214	121	56,5	9349	43,7	513	502	0	0
80	CO	GO	Morrinhos	SI	98	SI	8672	88,5	1375	593	1	0
81	CO	MS	Corumbá	200	70	35,0	3163	45,2	802	1099	0	0
82	CO	MS	Dourados	300	126	42,0	7404	58,8	1921	2104	6	7
83	CO	MS	Três Lagoas	274	80	29,2	4961	62,0	919	962	12	13
84	CO	MS	Coxim	188	43	22,9	1257	29,2	172	165	15	30
85	CO	MS	Ponta Porã	189	46	24,3	1979	43,0	455	453	0	0
86	CO	MS	<u>Campo Grande</u>	408	67	16,4	2988	44,6	663	611	0	0
87	CO	MT	<u>Cuiabá</u>	394	28	7,1	2075	74,1	2399	2369	62	88
88	CO	MT	Rondonópolis	900	158	17,6	8213	52,0	1207	1300	23	13
89	CO	MT	Confresa	108	69	63,9	7673	111,2	1581	1715	103	121
90	CO	MT	Alta Floresta	118	56	47,5	4670	83,4	1394	1411	246	170
91	CO	MT	Água Boa	202	SI	SI	3566	SI	518	510	3	7
92	CO	MT	Pontes e Lacerda	208	SI	SI	1536	SI	534	544	0	0
93	CO	MT	Juína	132	93	70,5	6773	72,8	735	1006	0	0
94	CO	MT	Barra do Garças	200	101	50,5	5987	59,3	503	503	7	34
95	CO	MT	Sinop	150	17	11,3	523	30,8	102	85	2	0
96	SE	ES	Cachoeiro do Itapemirim	286	163	57,0	9949	61,3	1846	1925	248	293
97	SE	ES	<u>Vitória</u>	448	233	52,0	20108	86,3	278	291	9	4
98	SE	ES	Nova Venécia	192	93	48,4	6833	73,5	506	503	17	39
99	SE	ES	Aracruz	202	SI	SI	9243	SI	500	531	2	13
100	SE	RJ	Angra dos Reis	323	107	33,1	3433	32,1	425	391	119	118
101	SE	RJ	Campos dos Goytacazes	330	119	36,1	5693	47,8	1386	1242	14	8
102	SE	RJ	Volta Redonda	296	183	61,8	16123	88,1	2140	2235	344	455
103	SE	RJ	<u>Rio de Janeiro</u>	612	306	50,0	18861	61,6	2399	2260	90	82
104	SE	MG	<u>Belo Horizonte</u>	1766	935	52,9	63893	68,3	2360	2175	93	96
105	SE	MG	Governador Valadares	288	230	79,9	13853	60,2	1731	1916	95	114
106	SE	MG	Juiz de Fora	404	37	9,2	1005	27,2	218	244	46	20
107	SE	MG	Montes Claros	396	68	17,2	1422	20,9	131	136	0	0
108	SE	MG	Uberaba	94	53	56,4	1902	35,9	273	289	0	0
109	SE	MG	Teófilo Otoni	296	110	37,2	3275	29,8	502	502	55	45
110	SE	MG	Coronel Fabriciano	264	SI	SI	3245	SI	107	103	0	0
111	SE	MG	Varginha	292	39	13,4	758	19,4	210	191	6	3
112	SE	MG	Patos de Minas	297	SI	SI	2981	SI	510	504	10	2
113	SE	SP	Ribeirão Preto	SI	SI	SI	646	SI	118	166	0	0
114	SE	SP	Presidente Prudente	SI	SI	SI	10675	SI	521	555	0	0
115	SE	SP	Sorocaba	SI	SI	SI	2167	SI	500	506	8	15
116	SE	SP	São José do Rio Preto	SI	SI	SI	801	SI	130	184	0	0
117	SE	SP	São Sebastião	SI	SI	SI	11529	SI	515	505	32	2
118	SE	SP	<u>São Paulo</u>	SI	SI	SI	3207	SI	500	529	0	0
119	S	PR	Foz do Iguaçu	298	72	24,2	4432	61,6	947	878	11	7
120	S	PR	Londrina	400	180	45,0	13935	77,4	1537	1955	37	59
121	S	PR	Paranavaí	200	50	25,0	3373	67,5	502	512	0	0
122	S	PR	Maringá	400	149	37,3	8996	60,4	504	500	0	3
123	S	PR	Francisco Beltrão	194	29	14,9	907	31,3	241	241	0	0
124	S	RS	Santa Rosa	200	116	58,0	8850	76,3	164	123	3	0
125	S	RS	Gravataí	292	175	59,9	10283	58,8	584	776	0	42
126	S	RS	Passo Fundo	300	164	54,7	6010	36,6	528	668	0	1
127	S	RS	Santa Maria	300	180	60,0	18185	101,0	524	502	0	2
128	S	RS	Quaraí	199	20	10,1	685	34,6	219	210	0	0
129	S	SC	São Miguel do Oeste	200	51	25,5	2349	46,1	664	637	18	6
130	S	SC	Xanxerê	200	89	44,5	3987	44,8	1000	1323	0	0
131	S	SC	Itajaí	300	219	73,0	9949	45,4	2074	2247	30	33
132	S	SC	Chapecó	300	143	47,7	14286	99,9	1050	1022	0	3

Notas: <sup>a</sup>Mosquitos adultos: total de mosquitos adultos (*Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*) da criação de cada população de campo (geração F0). <sup>b</sup>pp: percentual de paletas positivas. Sublinhado: capital de estado. SI: Sem informação. Siglas de regiões: N: Norte, NE: Nordeste, CO: Centro oeste, SE: Sudeste, S: Sul. Siglas de estados: AC: Acre, AM: Amazonas, AP: Amapá, PA: Pará, RO: Rondônia, RR: Roraima, TO: Tocantins, AL: Alagoas, BA: Bahia, CE: Ceará, PB: Paraíba, PE: Pernambuco, PI: Piauí, RN: Rio Grande do Norte, MA: Maranhão, SE: Sergipe, DF: Distrito Federal, GO: Goiás, MS: Mato Grosso do Sul, ES: Espírito Santo, RJ: Rio de Janeiro, MG: Minas Gerais, SP: São Paulo, PR: Paraná, RS: Rio Grande do Sul, SC: Santa Catarina.

### 5.1.3. Suscetibilidade de populações de campo de *Ae. aegypti* ao piriproxifeno em 2017-2018

A Tabela 4 apresenta os resultados do bioensaio do tipo dose resposta para determinar a dose diagnóstica de piriproxifeno para *Ae. aegypti*, realizado com a cepa Rockefeller. A dose diagnóstica (DD) obtida para o PPF foi de 0,3 µg/L (Tabela 4).

**Tabela 4.** Bioensaio tipo dose-resposta para determinar a dose diagnóstica de piriproxifeno para *Aedes aegypti*, cepa *Rockefeller*, 2017

<b>IE<sub>50</sub> (µg/L)<sup>a</sup></b>	<b>IC<sub>50</sub> (µg/L)<sup>b</sup></b>	<b>IE<sub>99</sub> (µg/L)<sup>a</sup></b>	<b>IC<sub>99</sub> (µg/L)<sup>b</sup></b>	<b>Slope</b>
0.06205	0,06012 - 0,06394	0.15589	0,14655 - 0,16733	5,8164

*Notas:* <sup>a</sup>IE<sub>50</sub> e IE<sub>99</sub>: concentrações de piriproxifeno necessárias para a inibição de 50% e de 99% dos adultos, respectivamente. <sup>b</sup>CI: intervalo de confiança.

Em relação a suscetibilidade ao PPF nota-se que dentre as 132 populações, seis (4,5%) apresentaram IE <98%, indicando resistência sugerida ao larvicida. Essas seis populações eram todas provenientes de cidades nordestinas brasileiras: Itabuna, Brumado e Serrinha (BA), Quixadá, Icó e Juazeiro do Norte (Ceará) (Tabela 5, Fig. 15).

**Tabela 5.** Distribuição dos percentuais de inibição da emergência de adultos (IE) de larvas de *Aedes aegypti* expostas ao larvicida PPF.

Nº	Região	Estado	Cidade	IE% controle	IE% (DD 0,3 µg/L) <sup>a</sup>	IE% corrigido <sup>b</sup>
1	N	AC	Cruzeiro do Sul	0,94	100,00	NN
2	N	AC	<u>Rio Branco</u>	1,61	100,00	NN
3	N	AC	Brasiléia	0,31	99,50	NN
4	N	AM	Parintins	0,94	100,00	NN
5	N	AM	São Gabriel da Cachoeira	3,25	100,00	NN
6	N	AM	Humaitá	1,88	100,00	NN
7	N	AM	Tabatinga	0,00	100,00	NN
8	N	AM	Coari	0,63	100,00	NN
9	N	AM	<u>Manaus</u>	1,50	100,00	NN
10	N	AP	<u>Macapá</u>	0,31	100,00	NN
11	N	AP	Oiapoque	2,81	100,00	NN
12	N	AP	Calçoene	1,56	100,00	NN
13	N	PA	Santarém	5,00	100,00	NN
14	N	PA	Xinguara	0,94	99,50	NN
15	N	PA	<u>Belém</u>	1,33	99,50	NN
16	N	PA	Breves	1,87	99,50	NN
17	N	PA	Marabá	2,75	99,40	NN
18	N	PA	Altamira	3,44	99,10	NN
19	N	PA	Itaituba	2,19	98,90	NN
20	N	PA	Tucuruí	3,43	98,90	NN
21	N	PA	Redenção	0,63	98,30	NN
22	N	RO	Cacoal	0,00	100,00	NN
23	N	RO	Jaru	0,50	100,00	NN
24	N	RO	<u>Porto Velho</u>	0,75	99,90	NN
25	N	RO	Guajará-Mirim	0,31	99,80	NN
26	N	RO	Vilhena	0,00	99,20	NN
27	N	RR	Rorainópolis	0,62	100,00	NN
28	N	RR	<u>Boa Vista</u>	0,25	98,80	NN
29	N	TO	Dianópolis	0,00	100,00	NN
30	N	TO	<u>Palmas</u>	2,25	100,00	NN
31	N	TO	Gurupi	0,63	99,90	NN
32	N	TO	Araguaína	2,49	98,40	NN

Nº	Região	Estado	Cidade	IE% controle	IE% (DD 0,3 µg/L) <sup>a</sup>	IE% corrigido <sup>b</sup>
33	NE	AL	<u>Maceió</u>	1,56	100,00	NN
34	NE	AL	Arapiraca	0,31	99,10	NN
35	NE	AL	Delmiro Gouveia	5,00	98,60	NN
36	NE	BA	Irecê	0,63	100,00	NN
37	NE	BA	<u>Salvador</u>	0,31	100,00	NN
38	NE	BA	Teixeira de Freitas	3,44	98,80	NN
<b>39</b>	<b>NE</b>	<b>BA</b>	<b>Itabuna</b>	0,94	<b>96,50</b>	NN
<b>40</b>	<b>NE</b>	<b>BA</b>	<b>Brumado</b>	1,56	<b>91,60</b>	NN
<b>41</b>	<b>NE</b>	<b>BA</b>	<b>Serrinha</b>	0,63	<b>85,80</b>	NN
42	NE	CE	<u>Fortaleza</u>	1,94	100,00	NN
43	NE	CE	Sobral	1,88	99,80	NN
44	NE	CE	Crateús	2,25	99,30	NN
<b>45</b>	<b>NE</b>	<b>CE</b>	<b>Quixadá</b>	3,75	<b>97,70</b>	NN
<b>46</b>	<b>NE</b>	<b>CE</b>	<b>Icó</b>	3,43	<b>96,10</b>	NN
<b>47</b>	<b>NE</b>	<b>CE</b>	<b>Juazeiro do Norte</b>	1,56	<b>95,30</b>	NN
48	NE	PB	Sousa	3,44	100,00	NN
49	NE	PB	<u>João Pessoa</u>	0,63	100,00	NN
50	NE	PB	Campina Grande	1,25	98,60	NN
51	NE	PB	Alagoa Grande	0,63	98,10	NN
52	NE	PE	<u>Recife</u>	0,00	100,00	NN
53	NE	PE	Salgueiro	0,31	100,00	NN
54	NE	PE	Garanhuns	0,94	100,00	NN
55	NE	PE	Petrolina	0,62	100,00	AI
56	NE	PE	Palmares	0,31	99,80	NN
57	NE	PE	Araripina	1,88	99,80	NN
58	NE	PE	Santa Cruz do Capibaribe	2,19	98,90	NN
59	NE	PI	Floriano	2,75	100,00	NN
60	NE	PI	<u>Teresina</u>	2,00	99,80	NN
61	NE	PI	Parnaíba	0,25	99,60	NN
62	NE	PI	Picos	6,87	98,40	98,30
63	NE	PI	São Raimundo Nonato	2,58	98,30	NN
64	NE	RN	<u>Natal</u>	0,00	100,00	NN
65	NE	RN	Pau dos Ferros	0,83	100,00	NN
66	NE	RN	Jardim do Seridó	3,44	100,00	NN
67	NE	RN	Mossoró	1,00	99,90	NN
68	NE	MA	<u>São Luís</u>	1,56	100,00	NN

Nº	Região	Estado	Cidade	IE% controle	IE% (DD 0,3 µg/L) <sup>a</sup>	IE% corrigido <sup>b</sup>
69	NE	SE	<u>Aracaju</u>	0,31	100,00	NN
70	NE	SE	Nossa Senhora da Glória	3,75	99,70	NN
71	NE	SE	Itabaiana	1,25	98,40	NN
72	NE	SE	Lagarto	4,00	98,20	NN
73	CO	DF	<u>Brasília</u>	1,25	100,00	NN
74	CO	GO	Minaçu	2,19	100,00	NN
75	CO	GO	Posse	1,25	100,00	NN
76	CO	GO	Cristalina	0,31	99,80	NN
77	CO	GO	<u>Goiânia</u>	3,44	99,40	NN
78	CO	GO	Iporá	0,50	99,10	NN
79	CO	GO	Jataí	0,75	98,30	NN
80	CO	GO	Morrinhos	0,94	98,10	NN
81	CO	MS	Corumbá	0,00	100,00	NN
82	CO	MS	Dourados	0,00	100,00	NN
83	CO	MS	Três Lagoas	0,63	100,00	NN
84	CO	MS	Coxim	3,13	100,00	NN
85	CO	MS	Ponta Porã	4,69	100,00	NN
86	CO	MS	<u>Campo Grande</u>	0,31	99,10	NN
87	CO	MT	<u>Cuiabá</u>	0,31	100,00	NN
88	CO	MT	Rondonópolis	0,63	100,00	NN
89	CO	MT	Confresa	2,19	100,00	NN
90	CO	MT	Alta Floresta	2,18	100,00	NN
91	CO	MT	Água Boa	1,25	99,80	NN
92	CO	MT	Pontes e Lacerda	1,88	99,80	NN
93	CO	MT	Juína	1,25	99,10	NN
94	CO	MT	Barra do Garças	1,88	98,70	NN
95	CO	MT	Sinop	0,94	98,70	NN
96	SE	ES	Cachoeiro do Itapemirim	1,88	100,00	NN
97	SE	ES	<u>Vitória</u>	3,00	99,50	NN
98	SE	ES	Nova Venécia	3,44	99,40	NN
99	SE	ES	Aracruz	1,24	98,10	NN
100	SE	RJ	Angra dos Reis	1,25	100,00	NN
101	SE	RJ	Campos dos Goytacazes	0,00	100,00	NN
102	SE	RJ	Volta Redonda	4,38	100,00	NN
103	SE	RJ	<u>Rio de Janeiro</u>	1,75	100,00	NN
104	SE	MG	<u>Belo Horizonte</u>	1,25	100,00	NN

Nº	Região	Estado	Cidade	IE% controle	IE% (DD 0,3 µg/L) <sup>a</sup>	IE% corrigido <sup>b</sup>
105	SE	MG	Governador Valadares	2,50	100,00	NN
106	SE	MG	Juiz de Fora	0,00	100,00	NN
107	SE	MG	Montes Claros	0,94	100,00	NN
108	SE	MG	Uberaba	0,31	100,00	NN
109	SE	MG	Teófilo Otoni	4,38	100,00	NN
110	SE	MG	Coronel Fabriciano	1,25	99,20	NN
111	SE	MG	Varginha	4,38	98,40	NN
112	SE	MG	Patos de Minas	0,94	98,10	NN
113	SE	SP	Ribeirão Preto	3,13	100,00	NN
114	SE	SP	Presidente Prudente	3,13	100,00	NN
115	SE	SP	Sorocaba	1,88	100,00	NN
116	SE	SP	São José do Rio Preto	0,63	99,80	NN
117	SE	SP	São Sebastião	2,81	99,80	NN
118	SE	SP	<u>São Paulo</u>	0,63	99,50	NN
119	S	PR	Foz do Iguaçu	0,00	100,00	NN
120	S	PR	Londrina	1,25	100,00	NN
121	S	PR	Paranavaí	2,25	100,00	NN
122	S	PR	Maringá	2,50	100,00	NN
123	S	PR	Francisco Beltrão	0,00	99,10	NN
124	S	RS	Santa Rosa	3,85	100,00	NN
125	S	RS	Gravataí	3,13	99,70	NN
126	S	RS	Passo Fundo	1,25	99,70	NN
127	S	RS	Santa Maria	3,08	98,80	NN
128	S	RS	Quaraí	4,36	98,50	NN
129	S	SC	São Miguel do Oeste	0,31	99,80	NN
130	S	SC	Xanxerê	0,00	99,60	NN
131	S	SC	Itajaí	1,56	99,50	NN
132	S	SC	Chapecó	2,50	98,40	NN

Notas: Resultados apresentados em percentual de inibição de emergência de adultos (IE) à dose diagnóstica do inseticida. <sup>a</sup>IE%: Percentual de inibição de emergência de adultos, Dose Diagnóstica (DD) 0,3 µg/L. <sup>b</sup>IE% corrigida: IE corrigida pela fórmula de Abbott quando necessário (quando esteve entre 5% e 10%). Sublinhado: capital de estado. Negrito: população não suscetível (IE ou mortalidade abaixo de 98%) (WHO, 2016a). AI: amostra insuficiente para realizar o ensaio. NN: correção não necessária. Siglas de regiões: N: Norte, NE: Nordeste, CO: Centro oeste, SE: Sudeste, S: Sul. Siglas de estados: AC: Acre, AM: Amazonas, AP: Amapá, PA: Pará, RO: Rondônia, RR: Roraima, TO: Tocantins, AL: Alagoas, BA: Bahia, CE: Ceará, PB: Paraíba, PE: Pernambuco, PI: Piauí, RN: Rio Grande do Norte, MA: Maranhão, SE: Sergipe, DF: Distrito Federal, GO: Goiás, MS: Mato Grosso do Sul, ES: Espírito Santo, RJ: Rio de Janeiro, MG: Minas Gerais, SP: São Paulo, PR: Paraná, RS: Rio Grande do Sul, SC: Santa Catarina.



**Figura 15.** Mapa brasileiro exibindo os resultados da avaliação de resistência ao IGR piriproxifeno nas populações de *Aedes aegypti*, 2017-2018. Círculos verdes ou diamantes laranja representam localidades das quais as populações foram suscetíveis ou com resistência sugerida (IE <98%), respectivamente. Os estados da Bahia (BA) e Ceará (CE) e seus municípios com populações avaliadas foram destacados.

As razões de resistência ( $RR_{50}$  e  $RR_{95}$ ) foram pequenas nessas populações, variando de 1,07 a 1,97 ( $RR_{50}$ ) ou 1,51 a 3,58 ( $RR_{95}$ ) (Tabela 6), portanto classificadas como de baixa resistência.

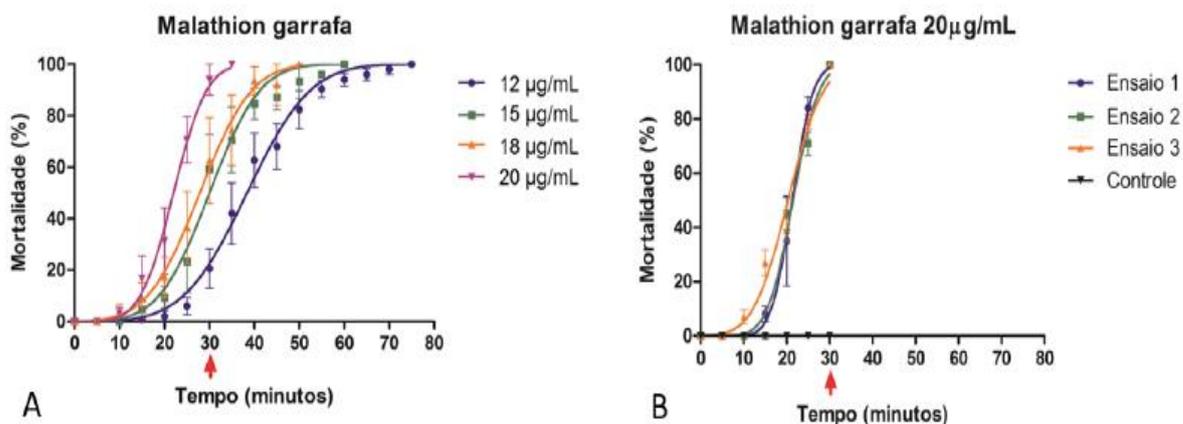
**Tabela 6.** Ensaio tipo dose-resposta com populações de *Aedes aegypti* resistentes ao PPF entre 2017 e 2018.

Região	Estado	População/Cidade	IE <sub>50</sub> (µg/L) <sup>a</sup> (IC)	IE <sub>95</sub> (µg/L) <sup>a</sup> (CI)	RR <sub>50</sub> <sup>b</sup>	RR <sub>95</sub> <sup>b</sup>	Slope	Nível de resistência <sup>c</sup>
		<i>Rockefeller</i>	0,0621 (0,0620-0,0639)	0,1190 (0,1137-0,1253)	1,00	1,00	5.81	-
NE	Bahia	Serrinha	0,1207 (0,0312-0,4665)	0,4257 (0,1711-1,0595)	1.95	3.58	3.00	Baixo
		Itabuna	0,1223 (0,0942-0,1588)	0,4056 (0,2776-0,5927)	1.97	3.41	3.16	Baixo
		Brumado	0,0666 (0,0510-0,0871)	0,3160 (0,2699-0,3699)	1.07	2.66	2.43	Baixo
	Ceará	Juazeiro do Norte	0,0835 (0,0498-0,1399)	0,2495 (0,1884-0,3304)	1.35	2.10	3.46	Baixo
		Quixadá	0,0900 (0,0800-0,0900)	0,2200 (0,2000-0,2400)	1.45	1.85	4.31	Baixo
		Icó	0,0700 (0,0600-0,0800)	0,1800 (0,1500-0,2200)	1.13	1.51	4.25	Baixo

Notas: <sup>a</sup>IE<sub>50</sub> e IE<sub>95</sub>: concentrações de piriproxifeno necessárias para a inibição de emergência de 50% e 95% de adultos, respectivamente. IC: intervalo de confiança. <sup>b</sup>RR<sub>50</sub> e RR<sub>95</sub>: razões de resistência. <sup>c</sup>Nível de resistência: RR<sub>95</sub><5,0: baixo; RR<sub>95</sub> entre 5.0 e 10.0: moderado; RR<sub>95</sub>>10.0: alto (Mazzari & Georghiou 1995).

#### 5.1.4. Suscetibilidade de populações de campo de *Ae. aegypti* ao malathion em 2017-2018

A DD obtida para o malathion em nossas condições de laboratório foi de 20 µg/garrafa (Fig. 16), 2,5x menor que a indicada pela OMS (DD 50 µg/garrafa).



**Figura 16.** Determinação da dose diagnóstica (DD) de malathion em *Aedes aegypti*, cepa Rockefeller. (A) Mortalidade ao longo do tempo de exposição a garrafas impregnadas com diferentes doses. (B) Três ensaios independentes adicionais, apenas com DD ajustada para 20 µg/ml, mostrando 100% de mortalidade em 30 minutos. A seta vermelha destaca o tempo de 30 minutos.

O percentual de mortalidade ao adulticida organofosforado malathion nas doses de 20 µg/garrafa e 50 µg/garrafa podem ser observadas na Tabela 7.

Quando expostas à DD local (20µg/garrafa), 28 populações (21,4%) apresentaram mortalidade acima de 98% (suscetível), 30 (22,9%) apresentaram mortalidade entre 90 e 98% (resistência sugerida) e 73 (55,7%) mortalidade abaixo 90% (resistência confirmada). Apenas nos estados Maranhão, onde apenas uma população foi avaliada, Mato Grosso do Sul e Rondônia não foram encontradas populações com resistência sugerida ou confirmada ao malathion utilizando-se esta DD, conforme mostram a Tabela 7 e a Fig. 17. Embora as localidades com populações com resistência sugerida ao malathion com a DD 20 µg/garrafa estejam espalhadas por todo o país, a região norte apresenta a

maior concentração daquelas com resistência confirmada, entre as avaliadas (71,9% das populações provenientes da região norte) (Fig. 17).

Por outro lado, quando expostas a 50  $\mu\text{g/garrafa}$ , a maioria das populações (121 ou 92,4%) foi considerada suscetível e as demais (10 ou 7,6%), com “resistência sugerida”, com mortalidade entre 90 e 98%. Esses municípios com populações que apresentaram resistência sugerida foram: Breves e Tucuruí no Pará, Crateús no Ceará, João Pessoa na Paraíba, Picos e São Raimundo Nonato no Piauí, Cristalina em Goiás, Alta Floresta no Mato Grosso, Cachoeiro do Itapemirim no Espírito Santo e Maringá no Paraná, de acordo com a Tabela 7 e com a Fig. 18.

**Tabela 7.** Mortalidade de populações de *Aedes aegypti* ao malathion, entre 2017 e 2018.

Nº	Região	Estado	Cidade	Malathion ( <i>Ae. aegypti</i> adultos)		
				Mort% controle	Mort% (DD 20 µg/L) <sup>a</sup>	Mort% (DD 50 µg/L) <sup>b</sup>
1	N	AC	Cruzeiro do Sul	0,00	<b>58,20</b>	99,30
2	N	AC	<u>Rio Branco</u>	0,00	<b>75,30</b>	99,00
3	N	AC	Brasiléia	0,00	<b>71,40</b>	99,40
4	N	AM	Parintins	0,00	<b>75,30</b>	100,00
5	N	AM	São Gabriel da Cachoeira	0,00	100,00	100,00
6	N	AM	Humaitá	0,00	<b>57,00</b>	99,70
7	N	AM	Tabatinga	0,00	<b>68,70</b>	98,70
8	N	AM	Coari	0,00	<b>63,30</b>	98,30
9	N	AM	<u>Manaus</u>	0,00	<b>41,00</b>	98,00
10	N	AP	<u>Macapá</u>	0,00	<b>80,60</b>	100,00
11	N	AP	Oiapoque	0,00	<b>93,30</b>	100,00
12	N	AP	Calçoene	0,00	<b>76,40</b>	98,80
13	N	PA	Santarém	0,00	<b>85,30</b>	98,80
14	N	PA	Xinguara	0,00	<b>75,50</b>	99,10
15	N	PA	<u>Belém</u>	0,00	<b>75,00</b>	98,60
16	N	PA	Breves	0,00	<b>83,20</b>	<b>97,20</b>
17	N	PA	Marabá	0,00	<b>79,50</b>	100,00
18	N	PA	Altamira	0,00	<b>88,10</b>	99,40
19	N	PA	Itaituba	0,00	<b>35,50</b>	99,40
20	N	PA	Tucuruí	0,00	<b>80,10</b>	<b>96,60</b>
21	N	PA	Redenção	0,00	<b>65,80</b>	98,50
22	N	RO	Cacoal	0,00	100,00	100,00
23	N	RO	Jaru	0,00	99,00	100,00
24	N	RO	<u>Porto Velho</u>	0,00	100,00	100,00
25	N	RO	Guajará-Mirim	0,00	99,30	100,00
26	N	RO	Vilhena	0,00	100,00	100,00
27	N	RR	Rorainópolis	0,00	<b>87,40</b>	100,00
28	N	RR	<u>Boa Vista</u>	0,00	<b>83,00</b>	100,00
29	N	TO	Dianópolis	0,00	99,30	100,00
30	N	TO	<u>Palmas</u>	0,00	<b>61,70</b>	99,70
31	N	TO	Gurupi	0,00	99,30	100,00
32	N	TO	Araguaína	0,00	<b>63,00</b>	99,10
33	NE	AL	<u>Maceió</u>	0,00	<b>92,30</b>	99,70
34	NE	AL	Arapiraca	0,00	<b>94,10</b>	99,40
35	NE	AL	Delmiro Gouveia	0,00	<b>56,90</b>	99,10
36	NE	BA	Irecê	0,00	99,30	100,00
37	NE	BA	<u>Salvador</u>	0,00	100,00	100,00
38	NE	BA	<u>Teixeira de Freitas</u>	0,00	<b>86,00</b>	99,10
39	NE	BA	Itabuna	0,00	<b>89,10</b>	98,10
40	NE	BA	Brumado	0,00	<b>86,80</b>	99,10
41	NE	BA	Serrinha	0,00	<b>83,10</b>	98,10
42	NE	CE	<u>Fortaleza</u>	0,00	<b>70,60</b>	98,30
43	NE	CE	Sobral	0,00	<b>44,20</b>	98,50
44	NE	CE	Crateús	0,00	<b>31,30</b>	<b>97,30</b>
45	NE	CE	Quixadá	0,00	<b>81,00</b>	100,00
46	NE	CE	Icó	0,00	<b>87,30</b>	100,00
47	NE	CE	Juazeiro do Norte	0,00	<b>58,80</b>	99,10
48	NE	PB	Sousa	0,00	<b>75,00</b>	99,30
49	NE	PB	<u>João Pessoa</u>	0,00	<b>64,30</b>	<b>91,30</b>
50	NE	PB	Campina Grande	0,00	<b>87,20</b>	99,70
51	NE	PB	Alagoa Grande	0,00	<b>88,90</b>	99,40
52	NE	PE	<u>Recife</u>	0,00	<b>97,30</b>	100,00
53	NE	PE	Salgueiro	0,00	100,00	100,00
54	NE	PE	Garanhuns	0,00	<b>94,50</b>	99,10
55	NE	PE	Petrolina	AI	AI	AI
56	NE	PE	Palmares	0,00	<b>96,00</b>	100,00
57	NE	PE	Araripina	0,00	<b>37,60</b>	98,80
58	NE	PE	Santa Cruz do	0,00	<b>93,90</b>	99,10
59	NE	PI	Floriano	0,00	100,00	100,00
60	NE	PI	<u>Teresina</u>	0,00	99,70	100,00
61	NE	PI	Parnaíba	0,00	98,30	100,00
62	NE	PI	Picos	0,00	<b>77,00</b>	<b>91,20</b>
63	NE	PI	São Raimundo Nonato	0,00	<b>81,10</b>	<b>92,90</b>
64	NE	RN	<u>Natal</u>	0,00	100,00	100,00
65	NE	RN	Pau dos Ferros	0,00	99,00	100,00
66	NE	RN	Jardim do Seridó	0,00	<b>87,20</b>	99,40
67	NE	RN	Mossoró	0,00	99,30	100,00
68	NE	MA	<u>São Luís</u>	0,00	99,60	100,00
69	NE	SE	<u>Aracaju</u>	0,00	99,30	100,00
70	NE	SE	Nossa Senhora da	0,00	<b>85,50</b>	98,40
71	NE	SE	Itabaiana	0,00	<b>95,00</b>	99,70
72	NE	SE	Lagarto	0,00	<b>89,00</b>	98,20
73	CO	DF	<u>Brasília</u>	0,00	<b>95,60</b>	100,00
74	CO	GO	Minaçu	0,00	<b>71,60</b>	100,00
75	CO	GO	Posse	0,00	<b>90,10</b>	98,20
76	CO	GO	Cristalina	0,00	<b>82,70</b>	<b>93,40</b>

Nº	Região	Estado	Cidade	Malathion ( <i>Ae. aegypti</i> adultos)		
				Mort% controle	Mort% (DD 20 µg/L) <sup>a</sup>	Mort% (DD 50 µg/L) <sup>b</sup>
77	CO	GO	<u>Goiânia</u>	0,00	<b>69,70</b>	98,60
78	CO	GO	Iporá	0,00	98,40	100,00
79	CO	GO	Jataí	0,00	<b>91,30</b>	100,00
80	CO	GO	Morrinhos	0,00	<b>68,90</b>	99,40
81	CO	MS	Corumbá	0,00	98,30	100,00
82	CO	MS	Dourados	0,00	99,30	100,00
83	CO	MS	<b>Três Lagoas</b>	0,00	<b>97,60</b>	100,00
84	CO	MS	Coxim	0,00	98,50	99,70
85	CO	MS	<b>Ponta Porã</b>	0,00	<b>90,70</b>	99,10
86	CO	MS	Campo Grande	0,00	99,00	100,00
87	CO	MT	<u>Cuiabá</u>	0,00	<b>82,00</b>	100,00
88	CO	MT	Rondonópolis	0,00	<b>82,50</b>	100,00
89	CO	MT	Confresa	0,00	<b>62,10</b>	99,70
90	CO	MT	Alta Floresta	0,00	<b>80,10</b>	<b>91,60</b>
91	CO	MT	Água Boa	0,00	<b>92,60</b>	100,00
92	CO	MT	Pontes e Lacerda	0,00	<b>84,20</b>	99,10
93	CO	MT	Juína	0,00	<b>94,10</b>	99,40
94	CO	MT	Barra do Garças	0,00	<b>88,60</b>	100,00
95	CO	MT	Sinop	0,00	<b>88,60</b>	100,00
96	SE	ES	Cachoeiro do	0,00	<b>46,80</b>	<b>94,30</b>
97	SE	ES	<u>Vitória</u>	0,00	<b>84,80</b>	99,70
98	SE	ES	Nova Venécia	0,00	<b>88,20</b>	99,10
99	SE	ES	Aracruz	0,00	<b>93,80</b>	98,50
100	SE	RJ	Angra dos Reis	0,00	<b>72,00</b>	100,00
101	SE	RJ	Campos dos Goytacazes	0,00	99,30	100,00
102	SE	RJ	Volta Redonda	0,00	<b>76,20</b>	100,00
103	SE	RJ	<u>Rio de Janeiro</u>	0,00	<b>83,00</b>	99,00
104	SE	MG	<u>Belo Horizonte</u>	0,00	<b>79,30</b>	100,00
105	SE	MG	Governador Valadares	0,00	<b>93,30</b>	100,00
106	SE	MG	Juiz de Fora	0,00	99,00	100,00
107	SE	MG	Montes Claros	0,00	100,00	100,00
108	SE	MG	Uberaba	0,00	98,30	100,00
109	SE	MG	Teófilo Otoni	0,00	<b>82,30</b>	99,40
110	SE	MG	Coronel Fabriciano	0,00	<b>63,50</b>	99,40
111	SE	MG	Varginha	0,00	<b>94,70</b>	99,70
112	SE	MG	Patos de Minas	0,00	<b>90,20</b>	99,70
113	SE	SP	Ribeirão Preto	0,00	<b>97,50</b>	100,00
114	SE	SP	Presidente Prudente	0,00	<b>97,80</b>	98,70
115	SE	SP	Sorocaba	0,00	<b>97,90</b>	98,50
116	SE	SP	São José do Rio Preto	0,00	<b>95,10</b>	99,10
117	SE	SP	São Sebastião	0,00	<b>87,90</b>	99,10
118	SE	SP	<u>São Paulo</u>	0,00	<b>86,10</b>	99,50
119	S	PR	Foz do Iguaçu	0,00	<b>86,70</b>	100,00
120	S	PR	Londrina	0,00	<b>78,00</b>	100,00
121	S	PR	Paranavaí	0,00	<b>91,10</b>	98,80
122	S	PR	Maringá	0,00	<b>78,40</b>	<b>96,50</b>
123	S	PR	Francisco Beltrão	0,00	<b>93,70</b>	99,70
124	S	RS	Santa Rosa	0,00	<b>90,60</b>	100,00
125	S	RS	Gravataí	0,00	<b>94,50</b>	98,80
126	S	RS	Passo Fundo	0,00	<b>97,30</b>	98,50
127	S	RS	Santa Maria	0,00	<b>57,80</b>	98,80
128	S	RS	Quaraí	0,00	<b>94,00</b>	100,00
129	S	SC	São Miguel do Oeste	0,00	<b>78,70</b>	100,00
130	S	SC	Xanxerê	0,00	<b>73,30</b>	99,10
131	S	SC	Itajaí	0,00	<b>87,70</b>	100,00
132	S	SC	Chapecó	0,00	98,10	100,00

Notas: Resultados apresentados em mortalidade à dose diagnóstica do inseticida.

<sup>a</sup>Mort%: Percentual de mortalidade, DD 20 µg/L. <sup>b</sup>DD 50 µg/L (WHO, 2016). Sublinhado: capital de estado. Negrito: população não suscetível (mortalidade abaixo de 98%) (WHO, 2016). SI: Sem informação. AI: amostra insuficiente para realizar o ensaio. NN: correção não necessária. Siglas de regiões: N: Norte, NE: Nordeste, CO: Centro oeste, SE: Sudeste, S: Sul. Siglas de estados: AC: Acre, AM: Amazonas, AP: Amapá, PA: Pará, RO: Rondônia, RR: Roraima, TO: Tocantins, AL: Alagoas, BA: Bahia; CE: Ceará, PB: Paraíba, PE: Pernambuco, PI: Piauí, RN: Rio Grande do Norte, MA: Maranhão, SE: Sergipe, DF: Distrito Federal, GO: Goiás, MS: Mato Grosso do Sul, ES: Espírito Santo, RJ: Rio de Janeiro, MG: Minas Gerais, SP: São Paulo, PR: Paraná, RS: Rio Grande do Sul, SC: Santa Catarina.



**Figura 17.** Mapa brasileiro exibindo os resultados da avaliação de resistência ao organofosforado malathion em populações de *Aedes aegypti*, 2017-2018, empregando a dose diagnóstica de 20 µg/garrafa. Círculos verdes, diamantes laranja ou triângulos vermelhos representam localidades das quais as populações foram consideradas suscetíveis, com resistência sugerida ou com resistência confirmada, respectivamente.



**Figura 18.** Mapa brasileiro exibindo os resultados da avaliação de resistência ao organofosforado malathion em populações de *Aedes aegypti*, 2017-2018, empregando a dose diagnóstica de 50 µg/garrafa. Círculos verdes ou diamantes laranja representam localidades das quais as populações foram consideradas suscetíveis ou com resistência sugerida, respectivamente.

## 5.2. Resultados dos ensaios de resistência (2020)

O número de armadilhas e paletas instaladas, paletas positivas, e os ovos obtidos para cada população de campo são resumidos na Tabela 8.

Um total de 440 larvas foram avaliadas em cada teste de DR, incluindo suas réplicas, requerendo 1.760 larvas de cada população para as quatro réplicas experimentais. O percentual de inibição de emergência de adultos da cepa suscetível (Rockefeller) sob nossas condições laboratoriais foi estimado em  $IE_{50} = 0,0042$  (IC 95% 0,0035 – 0,0048) e  $IE_{90} = 0,0086$  (IC 95% 0,0074 – 0,0110) (Tabela 9).

**Tabela 8.** Amostragem das populações de campo do *Aedes aegypti* no Brasil, 2020.

Estado	População/ Município	Armadilhas	Paletas		Ovos	
			Total	Positivas	Total	Média ovos/pp <sup>a</sup>
Bahia	Itabuna	150	300	162	11.444	70,60
	Brumado	100	220	154	24.327	158,00
	Serrinha	100	183	91	3.350	36,80
	Quixadá	100	210	73	3.520	48,20
Ceará	Juazeiro do Norte	150	300	210	16.694	79,50
	Icó	100	200	155	10.508	67,80

Nota: <sup>a</sup>Média de ovos por paleta positiva.

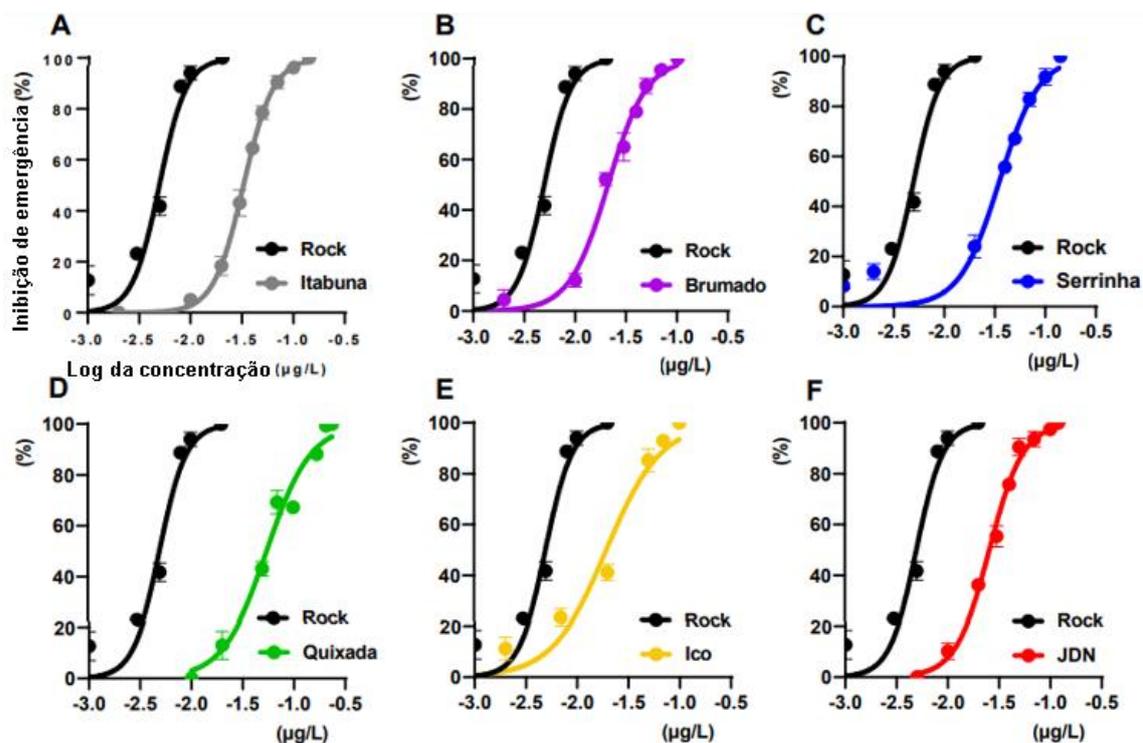
**Tabela 9.** Bioensaios dose-resposta em *Aedes aegypti* resistentes ao PPF no Brasil, 2020.

Estado	População/ Município	2020						2017/2018 <sup>b</sup>	
		IE <sub>50</sub> (µg/L) (IC)	IE <sub>95</sub> (µg/L) (IC)	RR <sub>50</sub>	RR <sub>95</sub>	Slope	Nível resist <sup>a</sup>	RR <sub>50</sub>	Nível resist <sup>a</sup>
	Rockefeller	0.0042 (0.0035-0.0048)	0.0086 (0.0074-0.0110)	1.00	1.00	4.09	-	1.00	-
Bahia	Itabuna	0.0331 (0.0313-0.0349)	0.0696 (0.0646-0.0758)	7.88	8.09	3.97	Moderado	1.97	Baixo
	Brumado	0.0203 (0.0117-0.0285)	0.0566 (0.0389-0.1272)	4.83	6.58	2.87	Baixo	1.07	Baixo
	Serrinha	0.0190 (0.0087-0.0363)	0.1655 (0.0762-0.7673)	4.52	19.24	1.36	Baixo	1.95	Baixo
Ceará	Quixadá	0.0462 (0.0298-0.0646)	0.1373 (0.0945-0.2653)	11.00	15.97	2.71	Alto	1.45	Baixo
	Juazeiro do Norte	0.0245 (0.0230-0.0261)	0.0570 (0.0527-0.0621)	5.83	6.63	3.50	Moderado	1.35	Baixo
	Icó	0.0098 (0.0046-0.0197)	0.1040 (0.0454-0.4736)	2.33	12.09	1.25	Baixo	1.13	Baixo

Notas: <sup>a</sup>Nível de resistência: RR<sub>50</sub> < 5,0: baixo; RR<sub>50</sub> 5.0-10.0: moderado; RR<sub>50</sub> > 10.0: alto (Mazzarri & Georghiou, 1995).

<sup>b</sup>Campos et al 2020.

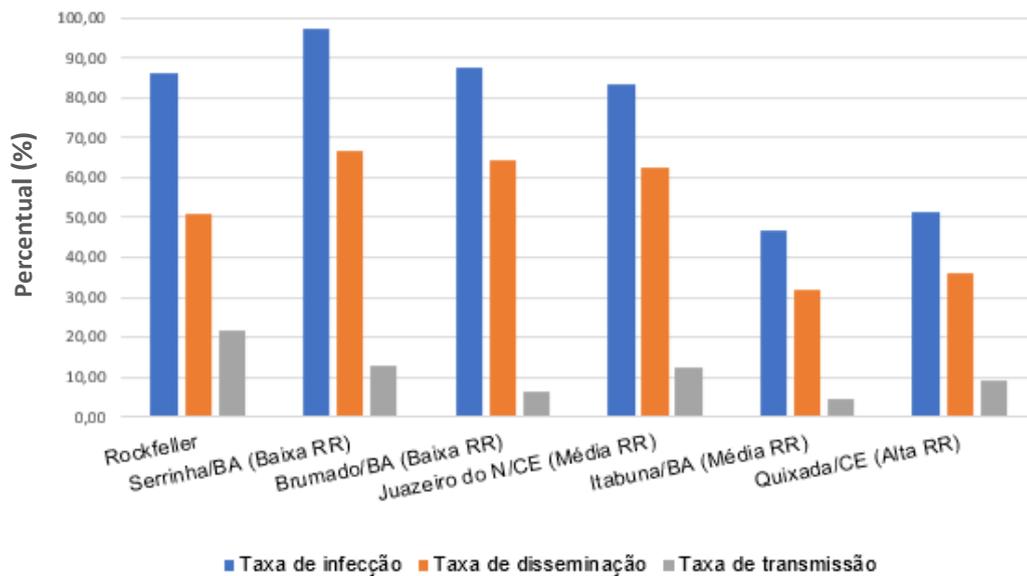
Bioensaios dose-resposta indicaram que *Ae. aegypti* das cidades do Nordeste brasileiro Itabuna, Brumado e Serrinha (Bahia); Quixadá, Juazeiro do Norte e Icó (Ceará) apresentaram razões de resistência ( $RR_{50}$ ) variando de 2,33 a 11,00; e  $RR_{90}$  variando das 6,58 às 19,24 (Tabela 9). Considerando os valores de  $RR_{50}$ , as populações dos municípios de Brumado, Serrinha e Icó tiveram baixas razões de resistência, indicando baixa resistência/alta suscetibilidade ao PPF. Em contraste, as populações de mosquitos de Itabuna (Bahia) e Juazeiro do Norte (Ceará) apresentaram resistência moderada, e a população de Quixadá (Ceará) apresentou alta resistência a PPF (Figura 19).



**Figura 19.** Inibição da emergência de adultos induzida por piriproxifeno para *Aedes aegypti* após a exposição a uma gama de doses. Doses são representados como transformação de  $\log_{10}$  em  $\mu\text{g/L}$ . As linhas representam o melhor ajuste para os dados. Os pontos representam uma inibição média de emergência de adultos de quatro réplicas biológicas. As barras de erro denotam o erro padrão.

### 5.3. Resultados de suscetibilidade de populações de *Ae. aegypti* resistentes ao PPF à infecção e transmissão do vírus Zika

O título viral das refeições de sangue infecciosas oferecidas às 150 fêmeas de cada população foi mensurado em  $6,35 \log_{10}$  PFUe/mL, valor aproximado aos títulos virêmicos de Zika observados em humanos (Lanteri et al., 2016). Das 900 fêmeas provenientes de populações resistentes e da população Rockefeller alimentadas, 276 sobreviveram ao período de incubação de 14 dias e foram testadas para a presença de ZIKV por meio do RT-PCR em seus corpos após a extração do RNA viral. A presença do ZIKV foi detectada em 208 desses corpos, sendo a taxa de infecção  $84,80 \pm 21,06$  e o título viral nestes corpos  $3,50 \pm 2,51 \log_{10}$  PFUe/mL (média  $\pm$  DP), para a totalidade das populações. O vírus foi ainda detectado nas pernas de 142 fêmeas, com taxa de disseminação  $56,74 \pm 15,15$  e o título viral nas pernas  $3,63 \pm 1,90 \log_{10}$  PFUe/mL (média  $\pm$  DP); e ainda na saliva de 31 delas, com taxa de transmissão  $10,90 \pm 6,13$  e título viral na saliva  $1,51 \pm 0,51 \log_{10}$  PFUe/mL (média  $\pm$  DP). As taxas de infecção, disseminação e transmissão da linhagem asiática de ZIKV em cada população de *Ae. aegypti*, e seus níveis de resistência ao piriproxifeno foram apresentadas na fig. 20. Títulos virais aproximados de ZIKV em populações de *Ae. aegypti* infectadas em laboratório foram relatados por Parker-Crockett e colaboradores (2021).



**Figura 20.** Taxas de infecção, disseminação e transmissão da linhagem asiática de ZIKV de cinco populações brasileiras de *Aedes aegypti*, e seus níveis de resistência ao piriproxifeno.

A análise de regressão logística mostrou um efeito altamente significativo da resistência ao PPF na suscetibilidade do mosquito à infecção pelo ZIKV ( $\chi^2 = 41,50$ ,  $df = 5$ ,  $p < 0,0001$ ). A suscetibilidade à infecção variou entre as cinco populações de mosquitos, onde as populações de baixa resistência exibiram taxas de infecção mais altas do que as populações de moderada ou alta resistência (Tabela 10).

**Tabela 10.** Regressão logística de populações de *Aedes aegypti* resistentes quanto à suscetibilidade à infecção (corpo).

População (Nível de resistência)	Média (Nº de amostras)	Erro padrão da média	Média inferior	Média superior
Rockefeller <sup>1</sup>	0,8491 (51) a	0,04917	0,7262	0,9227
Serrinha (Baixo)	0,9512 (39) a	0,03364	0,8248	0,9878
Brumado (Baixo)	0,8600 (48) a	0,04907	0,7343	0,9318
Juazeiro do Norte (Moderado)	0,8200 (48) a	0,05433	0,6889	0,9036
Itabuna (Moderado)	0,4694 (47) b	0,07129	0,3354	0,6079
Quixadá (Alto)	0,5111 (43) b	0,07452	0,3682	0,6523

Notas: Os resultados mostram as médias (escala de probabilidade), erros padrão e intervalos de confiança de 95% (médias inferior e superior) para suscetibilidade à infecção por Zika. Médias seguidas de letras diferentes denotam diferenças significativas. <sup>1</sup>Rockefeller: população suscetível de referência.

Não foram observados efeitos significativos da resistência ao PPF na infecção disseminada de ZIKV no tecido da perna ( $\chi^2 = 3,37$ ,  $df = 5$ ,  $p = 0,64$ ), ou transmissão por saliva infectada ( $\chi^2 = 8,25$ ,  $df = 5$ ,  $p = 0,14$ , Tabelas 11 e 12).

**Tabela 11.** Regressão logística de populações de *Aedes aegypti* resistentes quanto à suscetibilidade à infecção disseminada (pernas).

População (Nível de resistência)	Média (Nº de amostras)	Erro padrão da média	Média inferior	Média superior
Rockefeller <sup>1</sup>	0,5869 (44)	0,07260	0,4414	0,7187
Serrinha (Baixo)	0,6750 (38)	0,07406	0,5173	0,8010
Brumado (Baixo)	0,7273 (42)	0,06714	0,5787	0,8381
Juazeiro do Norte (Moderado)	0,7561 (40)	0,06707	0,6031	0,8634
Itabuna (Moderado)	0,6667 (22)	0,09623	0,4612	0,8237
Quixadá (Alto)	0,6667 (22)	0,09623	0,4612	0,8237

Notas: Os resultados mostram as médias (escala de probabilidade), erros padrão e intervalos de confiança de 95% (médias inferior e superior) para infecção disseminada por Zika. Não foram encontradas diferenças significativas entre as médias das populações. <sup>1</sup>Rockefeller: população suscetível de referência.

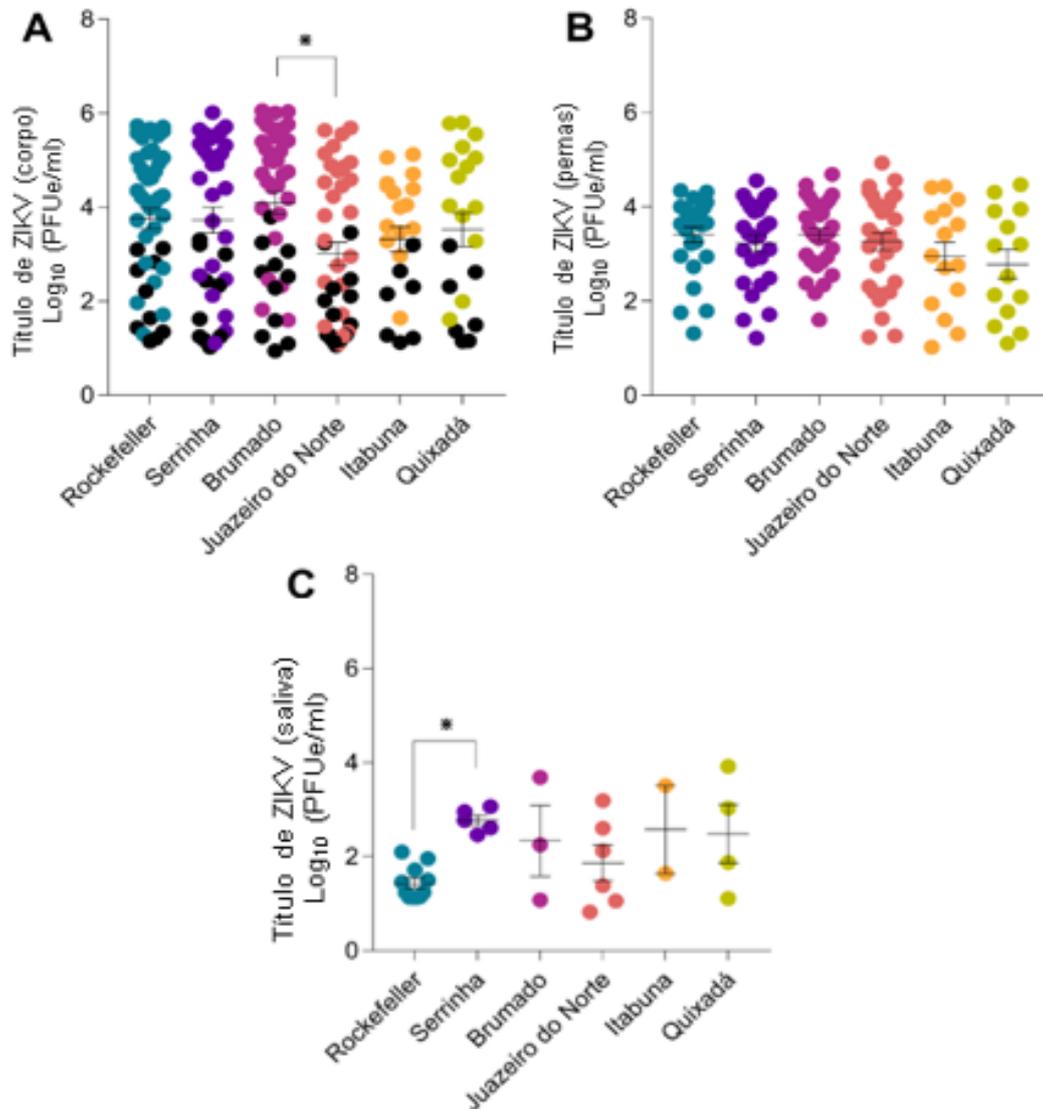
**Tabela 12.** Regressão logística de populações de *Aedes aegypti* resistentes quanto à suscetibilidade à transmissão (saliva).

População (Nível de resistência)	Média (Nº de amostras)	Erro padrão da média	Média inferior	Média superior
Rockefeller <sup>1</sup>	0,4286 (26)	0,09352	0,26190	0,6132
Serrinha (Baixo)	0,2143 (26)	0,07754	0,09957	0,4021
Brumado (Baixo)	0,1212 (31)	0,05682	0,04625	0,2818
Juazeiro do Norte (Moderado)	0,2188 (31)	0,07308	0,10800	0,3930
Itabuna (Moderado)	0,1765 (15)	0,09246	0,05801	0,4271
Quixadá (Alto)	0,2941 (15)	0,11050	0,12800	0,5419

Notas: Os resultados mostram as médias (escala de probabilidade), erros padrão e intervalos de confiança de 95% (médias inferior e superior) para infecção salivar por Zika. Não foram encontradas diferenças significativas entre as médias das populações. <sup>1</sup>Rockefeller: população suscetível de referência.

A análise de variância mostrou que a resistência ao PPF teve um efeito significativo nos títulos de ZIKV nos corpos ( $F = 2,33$ ,  $df = 5$ ,  $p = 0,04$ ) e saliva ( $F = 2,74$ ,  $df = 5$ ,  $p = 0,04$ ), mas não nas pernas ( $F = 1,31$ ,  $df = 5$ ,  $p = 0,26$ ). Embora a prevalência da infecção pelo ZIKV tenha sido altamente variável entre as populações, diferença no título viral foi observada apenas entre as populações de baixa resistência (Brumado) e moderada resistência (Juazeiro do Norte) (Fig. 21 a).

Médias semelhantes de títulos de ZIKV foram detectadas em pernas de mosquitos de diferentes populações (Fig. 21 b). No entanto, a população de baixa resistência (Serrinha) apresentou títulos virais mais elevados em comparação com a cepa suscetível ao inseticida (Rockefeller) (Fig. 21 c).



**Figura 21.** Títulos de ZIKV em corpos (a), pernas (b) e saliva (c) em 14 dpi para indivíduos derivados de cinco populações brasileiras de *Aedes aegypti* com diferentes níveis de resistência a PPF e uma cepa de *Aedes aegypti* (Rockefeller) suscetível a inseticidas. As barras representam médias  $\pm$  erro padrão das médias. Círculos pretos e coloridos em (a) representam títulos virais para mosquitos com infecções não disseminadas (ou seja, infecção por ZIKV limitada ao intestino médio) e infecções disseminadas (infecção por ZIKV disseminada para a hemocele), respectivamente. Os símbolos de asterisco acima dos gráficos denotam diferenças significativas após comparações de títulos virais entre grupos infectados.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Discussão dos resultados da avaliação de resistência aos inseticidas realizada em 2017 - 2018

Aqui se demonstrou, em 2017 e 2018, a possibilidade de avaliação do perfil de resistência de grande número de populações de campo de *Ae. aegypti* aos inseticidas utilizados para seu controle em saúde pública, em escala nacional, com protocolos de coleta e ensaios padronizados. O modelo aqui aplicado pode servir de assistência na implementação de planos nacionais de monitoramento em outros países. Foram descritas as atividades de amostragem e padronização dos testes de monitoramento da resistência a inseticidas para *Ae. aegypti* de 132 localidades brasileiras entre 2017 e 2018, o maior programa de monitoramento já realizado em um intervalo de menos de dois anos, discutindo seus resultados à luz do conhecimento adquirido desde a primeira rodada de monitoramento realizada em 1999. Para que isso fosse possível, foi necessária coordenação conjunta do Ministério da Saúde e do LAFICAVE, com participação das Secretarias Estaduais (SES) e Municipais de Saúde (SMS), além da realização dos ensaios no LAFICAVE e no LEnA. A oferta de material (insumos, cartilhas e vídeo instrucional) às SMS em apoio à coleta de ovos em campo foi outro elemento fundamental para alcance dos resultados.

Nos ensaios da primeira rodada de monitoramento, realizados com populações de *Ae. aegypti* coletadas em 2017 e 2018, foi obtida em laboratório a dose diagnóstica (DD) 0,3 µg/L para o piriproxifeno. Das populações avaliadas, 99,3% foram classificadas como suscetíveis ao larvicida. As seis populações resistentes são provenientes dos estados da Bahia (Itabuna, Brumado, Serrinha) e Ceará (Quixadá, Icó, Juazeiro do Norte), com valores de Razões de Resistência (RR<sub>50</sub> e RR<sub>95</sub>) variando de 1,07 a 1,97 (RR<sub>50</sub>) ou 1,51 a 3,58 (RR<sub>95</sub>), sugerindo resistência localizada ao IGR em um processo de seleção inicial. Levantou-se as hipóteses de que essa regionalização esteja relacionada às diferenças nas aplicações operacionais e à quantidade de inseticidas aplicados, peculiaridades genéticas populacionais ou à resistência cruzada ao larvicida

temefós (Marcombe et al., 2014; Hustedt et al., 2020), embora não haja evidências que sustentem tais hipóteses. Novas investigações são necessárias para entender melhor os mecanismos relacionados a essa tendência.

A exposição de populações de *Ae. aegypti* à DD de malathion indicada pela OMS (50 µg/garrafa) demonstrou que a maioria das populações (121 ou 92,4%) foi considerada suscetível, porém 10 populações (7,6%) foram classificadas com “resistência sugerida”, com mortalidade entre 90 e 98%. Tais populações estão distribuídas em Ceará, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Pará, Paraíba, Paraná e Piauí. Já a DD obtida no laboratório ou DD local (20µg/garrafa), 2,5x menor que a indicada pela OMS, permitiu confirmar a resistência de *Ae. aegypti* ao malathion em 73 populações, as quais apresentaram mortalidade abaixo 90%. O uso da DD local, mais sensível, permitiu a discriminação precoce da alteração na suscetibilidade ao malathion e o manejo do inseticida antes que sejam atingidos altos níveis de resistência, capazes de prejudicar a eficácia do controle químico do vetor.

Diante dos resultados obtidos na primeira rodada de monitoramento, recomendou-se a substituição do uso de PPF por uma classe alternativa de larvicida nos locais onde foram detectadas alterações de suscetibilidade, a fim de preservar a eficácia deste IGR. Quanto aos aduictidas, a troca do princípio ativo utilizado se mostrou necessária em todas as regiões do país, uma vez que foram detectadas populações resistentes dispersas no território. Portanto, demonstrou-se a necessidade de utilização de uma classe alternativa de inseticida para o controle de mosquitos adultos, considerando também o histórico previamente observado de resistência à piretroides no Brasil (Brasil, 2009b; Valle et al., 2015).

A amostragem das populações realizada na área externa das casas em territórios urbanos por meio de armadilhas de oviposição em 2017 e 2018 apresentou alta frequência de *Ae. albopictus* (presente em 59,8% dos municípios amostrados). Tal fato evidenciou a significativa expansão da espécie no país desde seu primeiro registro em áreas rurais, em 1986, tornando mais importante que outros estudos busquem a melhor compreensão do seu papel na transmissão de arbovirose no Brasil.

O monitoramento da resistência deve ser realizado continuamente, assim como a eficácia dos inseticidas utilizados em condições de campo e a avaliação de novos produtos. Além disso, evidenciou-se a importância da implementação de Estratégias de Gestão Integrada, que priorizam o controle mecânico e ações educativas, com o objetivo de diminuir o número de criadouros e a necessidade de aplicação de inseticidas (Roiz et al., 2018).

## **6.2. Discussão dos resultados da avaliação de resistência aos inseticidas realizada em 2020**

Esse estudo demonstrou a evolução da resistência ao PPF em *Ae. aegypti* em um curto período, destacando a importância do monitoramento regular e sistemático das populações de vetores para direcionamento das ações de controle a serem executadas. Aqui optamos pela comparação das  $RR_{50}$  das populações avaliadas com suas respectivas  $RR_{50}$  obtidas no estudo de 2017/18, uma vez que os valores de  $RR_{95}$  obtidos em 2020 foram mensurados nas análises Probit, e não valores observados no experimento.

As  $RR_{50}$  encontradas em 2020 foram de 2,1 a 7,6 vezes superiores aos relatados para ensaios do tipo dose-resposta (quantitativos) em 2017-2018. Os valores mais altos observados são consistentes com a expectativa de que uma proporção maior de indivíduos carregará polimorfismos de resistência ou alelos em resposta a seleção continuada (Liu, 2015), através da aplicação do PPF em uma frequência bimestral por dois a três anos. Comparando as classificações dos níveis de resistência das populações avaliadas àqueles mensurados nos ensaios de 2017 - 2018 (Campos et al., 2020), onde todos apresentaram baixos níveis de resistência, duas dessas populações apresentaram, em 2020, resistência moderada (Itabuna/Bahia e Juazeiro do Norte/Ceará) e uma apresentou alta resistência (Quixadá/Ceará).

Outros estudos já realizados na região Centro-Oeste do Brasil detectaram resistência baixa e moderada ao PPF ( $RR_{50}$  1,42–2,21 e  $RR_{50}$  1,7–7,7) em populações de *Ae. aegypti* (Moreira, 2018; Carvalho et al., 2020). A baixa resistência de *Ae. aegypti* ao PPF também foi relatada na Martinica ( $RR_{50}$  de 2,2), resistência moderada observada na Malásia ( $RR_{50}$  de 6,1) e alta nos EUA

(RR<sub>50</sub> de 38,7) (Marcombe et al., 2011; Lau et al., 2015; Su et al., 2019), enquanto não houve resistência ao PPF no Paquistão (Rahman et al., 2021).

Como ocorreu no estudo anterior, algumas populações apresentaram valores RR<sub>50</sub> e RR<sub>90</sub> discrepantes, representados por baixos valores *slope* (Tabela 9), o que sugere que a população é heterogênea e a resistência está se desenvolvendo em um processo inicial, com indivíduos suscetíveis e resistentes. A detecção de resistência a determinado inseticida ainda nesta fase permite que o produto em questão seja substituído a tempo de impedir o avanço da seleção, preservando assim a eficácia daquele produto para uso futuro.

Andrighetti et al. (2008) descreveram a resistência ao PPF em populações de Salvador e Barreiras (Bahia), e Bauru (São Paulo) (RR<sub>50</sub> de 6,5, 1,4 e 3,6, respectivamente) anos antes do início do uso do PPF para *Ae. aegypti* em saúde pública no Brasil. No momento, as populações mostraram, respectivamente, RR<sub>50</sub> de 11; 5,2 e 2,0 ao temefós, e os autores sugeriram a possibilidade de resistência cruzada entre PPF e temefós (Andrighetti et al., 2008). Os autores levantaram a hipótese de que a resistência cruzada é atribuível ao aumento da atividade de desintoxicação metabólica por diferentes enzimas, possivelmente relacionadas com a resistência ao temefós [alfa e beta esterases, oxidases de função mista (MFO) e glutathione-S-transferase (GST), com atividade encontrada também alterada em populações resistentes a IGR] (Andrighetti et al., 2008). Resultados do monitoramento da suscetibilidade de *Ae. aegypti* ao temefós entre 1985 e 2017 no Brasil mostraram que os maiores níveis de resistência ocorreram na região Nordeste, mesma onde observamos resistência ao PPF. Valores de RR<sub>95</sub> maiores que 100,0 ao larvicida organofosforado foram encontrados em 20% dos casos avaliados (Valle et al., 2019).

Além das diferenças genéticas entre populações de mosquitos, levantamos a hipótese de que as variações na frequência ou concentração de aplicação de inseticida podem ter contribuído para a variabilidade em seus níveis de resistência. Um aumento na frequência de aplicação de inseticidas geralmente ocorre quando as atividades de controle entomológico são intensificadas durante surtos de arbovírus. Além disso, as mudanças nas concentrações aplicadas podem acontecer devido a falhas no processo de aplicação. Uma análise do uso relativo de inseticidas pode contribuir ao nosso entendimento da associação com o desenvolvimento de resistência; entretanto,

tais dados não estão disponíveis para diferentes municípios. Identificação dos fatores específicos influenciando a evolução da resistência e os mecanismos está além do escopo do presente estudo. Estudos futuros devem considerar investigações para quantificar o uso relativo de inseticidas em diferentes municípios e mecanismos fisiológicos associados à resistência.

Aqui, encontramos RRs >5 ao PPF para populações brasileiras de *Ae. aegypti*. Ensaios de semi-campo realizados por Macoris et al. (2014) mostraram que, para populações de *Ae. aegypti* com RR >5 para neurotoxina temefós, falhas de controle em campo foram consideradas evidentes. O controle larvário em condições de campo foi aceitável para populações com RR <3 para temefós. No entanto, estudos que investigam o significado funcional em campo dos níveis da resistência aos IGRs ainda não foram relatados. Consequentemente, novas investigações sobre o impacto desses resultados em operações de controle de vetores são necessárias.

A emergência de resistência a inseticidas recém-desenvolvidos chama a atenção à necessidade de monitoramento regular do perfil de suscetibilidade das populações locais de mosquitos e, conseqüentemente, o planejamento de medidas de controle mais assertivas (Richards et al., 2020). Tal monitoramento permite demonstrar a evolução da resistência aos inseticidas no tempo e espaço, subsidiando a tomada de decisões oportunas para controle e manejo efetivo de vetores. Em 2021, o PPF foi gradativamente substituído pelo larvicida biológico Espinosade, derivado da fermentação da bactéria *Saccharopolyspora spinosa*, para controle larvário de *Ae. aegypti* no Brasil. A decisão de alternar o princípio ativo utilizado foi tomada pelo Ministério da Saúde do Brasil, considerando a detecção de seleção de resistência PPF em um processo inicial e o pequeno número de larvicidas pré-qualificados pela OMS para uso em água potável (WHO, 2023a).

Além dos possíveis impactos negativos sobre o ambiente, procedimentos de aplicação inadequados podem resultar em mais pressão seletiva sobre o inseto alvo vetor bem como em organismos não-alvo (Maciel-de-Freitas et al., 2014; Chediak et al., 2016; Macoris et al., 2018). Mapeamento das áreas de risco mais significativas dentro dos territórios é uma ferramenta que visa direcionar prontamente as ações de vigilância, que busca reduzir a intensidade e a

velocidade da dispersão de epidemias, contribuindo para o uso mais racional do controle químico (Honório, 2017; Siqueira et al., 2022).

Os resultados aqui apresentados apontam para a urgente necessidade de aplicação de estratégias de controle vetorial mais sustentáveis, tendo em vista que há poucas opções de produtos pré qualificadas pela OMS para o uso em água potável. Implementar medidas de gestão integrada, que contribuem para reduzir a necessidade de aplicação de inseticidas para o controle dos vetores, torna-se cada vez mais necessário com o surgimento de resistência a inseticidas recém-desenvolvidos. É também essencial melhorar as condições de saneamento básico, especialmente em áreas com maior risco de transmissão de arbovírus, para reduzir criadouros de forma sustentável. A priorização do controle mecânico e mobilização da comunidade para reduzir criadouros são de fundamental importância para a eficácia e sustentabilidade do controle de vetores (Roiz et al., 2018).

Investimentos para melhoria da infra estrutura urbana por meio da oferta de água encanada sem intermitência, coleta e destino regulares e adequados de inservíveis, além do reforço às ações educativas voltadas à manutenção de ambientes livres de criadouros, devem ser encarados como estruturantes e prioritários à saúde da população. Enquanto não ocorrerem avanços significativos em tais áreas, o controle químico de vetores continuará sendo realizado como medida prioritária para a redução dos casos de arboviroses, em detrimento de medidas mais sustentáveis de controle mecânico e manejo ambiental. A evolução da resistência aos inseticidas exige a adoção de formulações mais modernas de produtos e formulações para o controle de populações de mosquitos e que, ainda assim, poderão apresentar redução de eficácia em campo à medida que a suscetibilidade dos vetores diminui.

A amostragem, no presente estudo, de populações de mosquitos previamente suscetíveis ao larvicida PPF foi impedida por problemas operacionais decorrentes da pandemia de COVID-19. Especificamente, o isolamento social impôs a suspensão das visitas domiciliares pelos ACEs em alguns municípios. Reconhecemos que a falta de amostragem de outras populações que não apresentaram suscetibilidade alterada ao PPF foi uma limitação deste trabalho.

### **6.3. Discussão dos resultados de suscetibilidade de populações de *Ae. aegypti* resistentes ao PPF à infecção e transmissão do vírus Zika**

A região Nordeste do Brasil foi a primeira e mais severamente afetada pela epidemia de ZIKV em 2014 e 2015 (Campos et al., 2015; Brito, 2015). Três anos depois, populações de *Ae. aegypti* resistentes ao larvicida PPF foram detectadas em algumas cidades da mesma região (Campos et al., 2020), o que se previu prejudicar o controle de arboviroses transmitidas por mosquitos. No entanto, alguns autores sugeriram que a RI também pode afetar o controle do mosquito por meio de alterações nas características do vetor, especialmente na longevidade, competência e comportamento do vetor (Rivero et al., 2010). Nós investigamos a relação entre a resistência ao PPF e a suscetibilidade à infecção e transmissão do ZIKV em populações de *Ae. aegypti* coletadas em cinco cidades da região Nordeste do Brasil, que demonstraram diferentes níveis de resistência ao PPF: baixa (Serrinha, Brumado), moderada (Juazeiro do Norte, Itabuna) e alta (Quixadá).

Estudos de transmissão de patógenos por vetores em laboratório podem ser realizados por meio de métodos diretos ou indiretos. Nos métodos diretos, animais de laboratório são expostos ao repasto sanguíneo por vetores infectados, num processo de alto custo que exige treinamento profissional, instalações adequadas e licenças para uso de animais (Reynolds et al., 2017).

Os métodos indiretos são mais acessíveis e custo-efetivos, entretanto mais trabalhosos, como a análise de saliva depositada pelos mosquitos em tubos capilares após mobilização individual, saliva depositada durante a alimentação açucarada em papéis com (cartão FTA®, Q-paper, USTOP-card) ou sem reagentes (papel filtro) para a preservação do ácido nucleico; ou ainda a pesquisa do patógeno em tecidos de glândulas salivares, pernas ou corpos dos insetos (Glushakova et al., 2017; Glushakova et al., 2018; Honório et al., 2020; Gloria-Soria et al., 2022). Estudo comparativo da eficácia de diferentes métodos de coleta salivar para detecção de dois genótipos do vírus chikungunya (CHIKV) em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* demonstrou que o cartão FTA (papel com reagente para preservação do ácido nucléico) saturado com mel foi significativamente mais eficaz do que o tubo capilar; e que, no caso do genótipo

asiático do vírus, papel filtro saturado com mel foi tão eficaz quanto tubo capilar (Honório et al., 2020). Gloria-Soria e coautores (2022) sugeriram que a avaliação da transmissão viral por meio do método de salivacção forçada em tubos capilares tende a subestimar a presença do vírus na saliva dos mosquitos.

Glushakova e colaboradores relataram em 2017, pela primeira vez, o uso do Q-paper como uma plataforma eficiente para recuperar ácidos nucleicos virais e outros tipos de amostras biológicas. Uma vantagem desta estratégia é a possibilidade de detecção do ácido nucléico diretamente do Q-paper, sem as etapas demoradas da purificação de RNA (Glushakova et al., 2018).

No presente experimento, o uso de marcador visual no processo de alimentação dos mosquitos permitiu que apenas aqueles que haviam se alimentado e, portanto, depositaram saliva no Q-paper, fossem congelados e posteriormente processados (dissecação e PCR). Isso possibilitou a infecção de centenas de mosquitos em um mesmo dia e o menor manuseio de infectados para análise, comparativamente a outros métodos como a salivacção forçada em tubos capilares, por exemplo.

Variações na suscetibilidade à infecção, infecção disseminada e transmissão entre diferentes populações de mosquitos e cepas virais são esperadas (Zimler e Alto, 2019). Neste estudo, as taxas de infecção em 14 dpi por ZIKV em populações de campo de *Ae. aegypti* variaram entre 51,16% e 97,44% (corpo); 31,91% e 66,67% (pernas) e 4,26% e 12,82% (saliva), respectivamente. Para a cepa Rockefeller suscetível, as taxas de infecção foram de 86,27%, 50,98% e 21,57% em corpos, pernas e saliva, respectivamente. Catorze dias após infectar uma população de *Ae. aegypti* resistente a piretróides com 6,3 - 6,5 log<sub>10</sub> PFUe/ml da linhagem asiática do ZIKV, Parker-Crockett e colaboradores (2021) encontraram taxas de infecção semelhantes, de 83%, 66% e 20% para o corpo, pernas e saliva, respectivamente.

Estudos anteriores examinaram os impactos da exposição ao PPF na competência de vetores de mosquito para arbovírus (Alomar et al., 2020; Alomar et al., 2021). Por exemplo, a exposição de mosquitos *Ae. aegypti* ao PPF em estágios larvais alterou sua suscetibilidade ao ZIKV, especificamente, estes indivíduos exibiram aumento da infecção e transmissão do ZIKV (Alomar et al., 2021). Os autores sugeriram que a alteração na competência do vetor para ZIKV

em mosquitos que sobrevivem à exposição ao PPF durante os estágios imaturos pode estar associada à variação no tamanho do adulto e outras alterações fisiológicas (por exemplo, alterações induzidas pelo estresse) que podem modificar suas respostas à infecção pelo vírus (Alomar et al., 2021). Os estudos anteriores ocorreram durante uma única geração. Em contraste, as avaliações da influência da RI na competência vetorial de arbovírus ocorrem ao longo de múltiplas gerações, permitindo a possibilidade de evolução da RI. Assim, não se pode esperar que diferenças nas competências de vetor compartilhem efeitos ou mecanismos direcionais semelhantes.

Até onde sabemos, nosso estudo é o primeiro a examinar a influência de diferentes níveis de resistência ao PPF nas respostas do mosquito à infecção por arbovírus. Mostramos que as populações de Itabuna e Quixadá, que apresentam respectivamente níveis moderados a altos de resistência ao PPF, apresentaram menor suscetibilidade à infecção pelo ZIKV do que outras populações, incluindo a cepa suscetível a inseticidas (Rockefeller). Nossos resultados mostraram potencial associação entre RI e infecção por arbovírus, que pode ser atribuída à *genetic hitchhiking* (ou carona genética, na língua portuguesa). De acordo com Friedlander & Steinrücken (2022), *genetic hitchhiking* ocorre quando a ligação cromossômica permite que a dinâmica de um local selecionado afete a variação genética em loci neutros próximos.

Estudos com *Drosophila* e *Ae. aegypti* mostram que a variação genética de loci seletivamente neutros em um genoma pode ser restringida pela fixação de mutações vantajosas associadas ao efeito de *genetic hitchhiking* (Yan et al., 1998). Ou seja, a variação de loci seletivamente neutros pode ser restringida por um efeito genético de carona em regiões do genoma sob seleção extensiva, como pode ser o caso em mosquitos que são frequentemente expostos a inseticidas (Yan et al., 1998; Maynard Smith & Haigh, 1974). Por exemplo, prevê-se que genes intimamente ligados aos loci alvo do inseticida organofosforado exibem variação genética reduzida devido a um efeito de carona genético associado à seleção intensiva de inseticidas organofosforados (Yan et al., 1998). Conceitos semelhantes foram investigados e sugeridos para o impacto da resistência a inseticidas na imunidade de *Culex pipiens* (Vézilier et al., 2012).

Os mecanismos de resistência ao PPF em mosquitos ainda não são totalmente compreendidos. O envolvimento da superexpressão das atividades das enzimas de desintoxicação de P450 e GST foi sugerido (Yunta et al., 2016). Aumentos significativos nas atividades das enzimas de desintoxicação também foram relatados em *Ae. albopictus* resistente ao PPF, corroborando a hipótese de que tal resistência tem base metabólica (Marcombe et al., 2014).

Stephenson e coautores (2021) avaliaram a suscetibilidade de mosquitos com diferentes perfis de resistência a piretróides à infecção e transmissão de vírus da dengue (DENVs). Os autores encontraram uma associação negativa entre a frequência de mutações *kdr* (relacionadas à resistência ao knockdown de piretróides) e competência vetorial para DENV em *Ae. aegypti*. Especificamente, os mosquitos com a maior frequência de alelos mutantes L1016 e C1534 tiveram menores taxas de infecção e transmissão do que aqueles com baixa ou nenhuma frequência de alelos mutantes *kdr* (Stephenson et al., 2021).

Menor taxa de vida adulta foi relatada em *Ae. albopictus* resistentes à deltametrina, em comparação com a linha suscetível, e quando essas duas linhagens foram desafiadas oralmente com DENV-2, os indivíduos resistentes à deltametrina mostraram uma redução nas taxas de infecção e títulos virais de DENV-2 na cabeça, glândulas salivares e ovários em 14 dpi (Deng et al., 2021). Os autores também encontraram transmissão horizontal para camundongos e transmissão vertical para sua progênie mais baixas nesses mosquitos resistentes (Deng et al., 2021).

O maior nível de resistência à deltametrina foi associado às menores taxas de disseminação do vírus chikungunya em *Ae. aegypti* (Wang et al., 2022). Juntas, essas observações, juntamente com nosso estudo, sugerem que os mosquitos que apresentam resistência a inseticidas podem apresentar custos de aptidão e menor suscetibilidade à infecção por arbovírus. Por outro lado, outros estudos observaram uma associação positiva entre RI e competência vetorial para arbovírus. Um estudo de Atyame e coautores (2022) determinou a influência da RI em linhagens de *Cx. quinquefasciatus* resistentes a organofosforados, onde essas linhagens demonstraram maior competência vetorial do que a linha de referência suscetível a inseticidas para o vírus do Nilo Ocidental (Atyame et

al., 2019). Maiores taxas de infecção por ZIKV foram observadas em uma população de *Ae. aegypti* resistente a piretróides (Parker-Crockett et al., 2021). Mosquitos *Ae. aegypti* selecionados por permetrina demonstraram aumento significativo nas taxas de disseminação do DENV-1 (Chen et al., 2021).

Embora as razões responsáveis por essas variações entre os estudos de RI e de competência vetorial não sejam conhecidas, elas podem ser atribuídas a diferentes mecanismos envolvidos na RI, antecedentes genéticos entre populações de mosquitos e cepas de vírus.

Em conclusão, nossos dados revelaram que o *Ae. aegypti* com diferentes perfis de resistência ao PPF apresentam suscetibilidade alterada às infecções pelo ZIKV, especificamente menores taxas de infecção entre as populações de Itabuna e Quixadá que exibiram moderada e alta resistência ao PPF, receptivamente. Embora nosso estudo tenha sugerido um benefício indireto de redução das taxas de infecção de ZIKV em algumas populações de mosquitos resistentes a PPF, é essencial continuar aplicando estratégias de mitigação de RI considerando que todas as populações foram capazes de transmitir ZIKV e considerando que relatórios anteriores detectaram aumentos na competência vetorial de mosquitos resistentes a alguns arbovírus. Mais estudos são necessários para entender melhor a relação entre a RI e as respostas do mosquito à infecção e transmissão de arbovírus, incluindo populações de campo suscetíveis aos inseticidas.

## 7. CONCLUSÕES

- Identificamos, em ensaios realizados em 2017/2018, níveis baixos de resistência de populações de *Ae. aegypti* provenientes da região nordeste Brasil ao larvicida IGR PPF, além de resistência confirmada ao malathion naqueles provenientes de todas as regiões do país. Estes resultados subsidiaram a substituição, pelo Ministério de Saúde, do larvicida e do adulticida então utilizados para controle de *Ae. aegypti* em saúde pública por produtos alternativos, a partir de 2020.
- A avaliação da resistência das populações de *Ae. aegypti* coletadas em 2020 ao PPF demonstrou evolução da mesma em um curto período de tempo. Evidenciou-se a importância do monitoramento da resistência das populações de vetores aos inseticidas de maneira regular e sistemática, permitindo melhor direcionamento das ações de controle.
- Constatamos, ainda, que os mosquitos derivados de populações com níveis moderados a altos de resistência ao PPF exibiram suscetibilidade semelhante ou menor à infecção por ZIKV. Recomenda-se a realização de novas pesquisas sobre a capacidade de infecção e transmissão para outros arbovírus e com populações de mosquitos procedentes de outras áreas do país.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achee NL, Gould F, Perkins TA, Reiner Jr RC, Morrison AC, Ritchie SA, et al 2015. A critical assessment of vector control for dengue prevention. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003655.
- Adegas MG, Barroso-Krause C, Lima JBP, et al 2005. Parâmetros de Biossegurança para Insetários e Infectórios de Vetores: aplicação e adaptação das normas gerais para laboratórios definidas pela Comissão Técnica de Biossegurança da Fiocruz. Rio de Janeiro: Fiocruz.
- Aizoun N, Ossè R, Azondekon R, Alia R, Oussou O, Gnanguenon V, et al 2013. Comparison of the standard WHO susceptibility tests and the CDC bottle bioassay for the determination of insecticide susceptibility in malaria vectors and their correlation with biochemical and molecular biology assays in Benin, West Africa. *Parasites and Vectors* 6(1):147–56.
- Almeida PR, Ehlers LP, Demoliner M, Eisen AKA, Girardi V, De Lorenzo C, et al 2020. Detection of a novel African-lineage-like Zika virus naturally infecting freelifving neotropical primates in Southern Brazil. *bioRxiv* 828871.
- Alomar AA, Alto BW 2021. Mosquito responses to lethal and nonlethal effects of predation and an insect growth regulator. *Ecosphere* 12:e03452.
- Alomar AA, Alto BW 2022. Evaluation of pyriproxyfen effects on *Aedes aegypti* and predatory mosquito *Toxorhynchites rutilus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 59:585-590.
- Alomar AA, Alto BW 2022. Temperature-mediated effects on Mayaro virus vector competency of Florida *Aedes aegypti* mosquito vectors. *Viruses* 14:880.
- Alomar AA, Eastmond BH, Alto BW 2020. The effects of exposure to pyriproxyfen and predation on Zika virus infection and transmission in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* 14:e0008846.
- Alomar AA, Eastmond BH, Alto BW 2021. Juvenile hormone analog enhances Zika virus infection in *Aedes aegypti*. *Sci Rep* 11:21062.
- Alomar AA, Eastmond BH, Rapti Z, Walker ED, Alto BW 2022. Ingestion of spinosad-containing toxic sugar bait alters *Aedes albopictus* vector competence and vectorial capacity for dengue virus. *Front Microbiol* 13: 933482.
- Andrighetti MTM, Cerone F, Rigueti M 2008. Effect of pyriproxyfen in *Aedes aegypti* populations with different levels of susceptibility to the organophosphate temephos. *Dengue Bul Geneva* (32):186-198.
- Andrighetti MTM, Cerone F, Rigueti M 2008. Effect of pyriproxyfen in *Aedes aegypti* populations with different levels of susceptibility to the organophosphate temephos. *Dengue Bul Geneva* (32):186-198.
- Arragain L, Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Sigur N, Grangeon J, Huguon E, et al 2017. Vertical transmission of dengue virus in the peripartum period and viral kinetics in newborns and breast milk: new data. *J Pediatric Infect Dis Soc* 6: 324–31.

Atyame CM, Alout H, Mousson L, Vazeille M, Diallo M, Weill M, et al 2019. Insecticide resistance genes affect *Culex quinquefasciatus* vector competence for West Nile virus. *Proc R Soc B* 286:20182273.

Ayu SM, Lai LR, Chan YF, Hatim A, Hairi NN, Ayob A, et al 2010. Seroprevalence survey of Chikungunya virus in Bagan Panchor, Malaysia. *Am J Trop Med Hyg* 83(6):1245–1248.

Balabanidou V, Grigoraki L, Vontas J 2018. Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science* 27:68–74.

Bergamin Filho A, Amorim L 1996. Doenças de Plantas Tropicais: Epidemiologia e Controle Econômico. São Paulo: Ceres.

Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D 2014. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill* 19:20751.

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496(7446):504–7.

BissetLazcano JA, Rodríguez MM, San Martín JL, Romero JE, Montoya R 2009. Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. *Rev Panam Salud Publica* 26(3):229-234.

Boyce R, Lenhart A, Kroeger A, Velayudhan R, Roberts B, Horstick O 2013. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. *Trop Med Int Heal* 18(5):564–77.

Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al 2012. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Negl Trop Dis* 6(8).

Brady OJ, Hay SI 2020. The global expansion of dengue: how *Aedes aegypti* mosquitoes enabled the first pandemic arbovirus. *Annu Rev Entomol* 65:191–208.

Braga IA, Valle D 2007. *Aedes aegypti*: Surveillance, resistance monitoring, and control alternatives in Brazil. *Epidemiol Serv Saúde* 16(4):295-302.

Brasil, Ministério da Saúde 2022a. Situação epidemiológica da síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika: Brasil, 2015 a 2022, até a SE 31. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde 53(35). Coordenação-Geral de Informações e Análises Epidemiológicas do Departamento de Análise Epidemiológica e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no35/view>>. Acesso em: 14 Fev 2023.

Brasil, Ministério da Saúde 2022b. Coordenação-Geral de Vigilância de Arboviroses. Nota Técnica Nº 39/2022-CGARB/DEIDT/SVS/MS.

Brasil. Ministério da Saúde 2006. Reunião Técnica para Discutir Status de Resistência de *Aedes aegypti*. Rio de Janeiro: Secretaria de Vigilância em Saúde/Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue.

Brasil. Ministério da Saúde 2008. Metodologia de amostragem de *Aedes aegypti* por meio de armadilhas de postura (ovitrampas). Documento da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas (MoReNAa). Brasília: Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde.

Brasil. Ministério da Saúde 2009a. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue. Brasília: Ministério da Saúde. 160 p.

Brasil. Ministério da Saúde 2009b. Manejo da resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue. Nota técnica nº. 013/2009, CGPNCD/DIGES/SVS/MS. Brasília: Ministério da Saúde.

Brasil. Ministério da Saúde 2016. Relatório da reunião internacional para implementação de alternativas para o controle do *Aedes aegypti* no Brasil. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde 47(15).

Brasil. Ministério da Saúde 2017. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde 48(3).

Brasil. Ministério da Saúde 2019. Guia de Vigilância em Saúde: volume único (recurso eletrônico). Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. 3ª. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

Brasil. Ministério da Saúde 2020a. Coordenação-Geral de Vigilância de Arboviroses. Nota Técnica Nº 1/2020-CGAR/DEIDT/SVS/MS. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/notas-tecnicas/2020/nota-tecnica-no-12020-cgarbdeidtsvms.pdf/view>>. Acesso em: 09 Abr 2023.

Brasil. Ministério da Saúde 2020b. Coordenação-Geral de Vigilância de Arboviroses. Nota Técnica Nº 5/2020-CGAR/DEIDT/SVS/MS. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/notas-tecnicas/2020/nota-tecnica-no-52020-cgarbdeidtsvms.pdf/view>>. Acesso em: 09 Abr 2023.

Brasil. Ministério da Saúde 2021. Orientações técnicas para utilização do larvicida Espinosade para o controle de *Aedes aegypti*. Coordenação-Geral de Vigilância de Arboviroses. Nota Técnica Nº 10/2021-CGAR/DEIDT/SVS/MS. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/notas-tecnicas/2021/nota-tecnica-no-102021-cgarbdeidtsvms.pdf/view>>. Acesso em: 09 Abr 2023.

Brasil. Ministério da Saúde 2023. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Casos prováveis de dengue por ano de notificação segundo o município de residência, 2017 a 2021. Dados atualizados em 03/2022, sujeitos a revisão. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/denguebbr.def>>. Acesso em 15 Fev 2023.

Briet OJ & Chitnis N 2013. Effects of changing mosquito host searching behaviour on the cost effectiveness of a mass distribution of long-lasting insecticidal nets: a modelling study. *Malaria Journal* 12:215.

- Brito C 2015. Zika virus: A new chapter in the history of medicine. *Acta Med Port* 28:679–680.
- Brogdon WG, McAllister JC 1998: Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Dis* 4(4):605–613.
- Brouard C, Bernillon P, Quatresous I, et al 2008. Estimated risk of Chikungunya viremic blood donation during an epidemic on Reunion Island in the Indian Ocean, 2005 to 2007. *Transfusion* 48:1333–41.
- Cabral-Castro MJ, Cavalcanti MG, Peralta RH, Peralta JM 2016. Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV, ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients. *J Clin Virol* 82:108–111.
- Camargo S 1967. História da erradicação do *Aedes aegypti* nas Américas. *Bull. Wld Hlth Org* 36:602-603.
- Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. 2015a. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* 21:1885–1886.
- Campos KB, Amâncio FF, de Araújo VEM, Carneiro M 2015b. Factors associated with death from dengue in the state of Minas Gerais, Brazil: historical cohort study. *Trop Med Int Health* 20:211–218.
- Campos KB, Martins AJ, Rodovalho CdM, Bellinato DF, Dias LdS, Macoris MdLdG, et al 2020. Assessment of the susceptibility status of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations to pyriproxyfen and malathion in a nation-wide monitoring of insecticide resistance performed in Brazil from 2017 to 2018. *Parasites Vectors* 13:1–18.
- Campos KB, Martins AJ, Rodovalho CM, Bellinato DF, Dias LS, Macoris MLG, et al 2020. Assessment of the susceptibility status of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations to pyriproxyfen and malathion in a nation-wide monitoring of insecticide resistance performed in Brazil from 2017 to 2018. *Par & Vect* 13:531-549.
- Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, et al 2016. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *Lancet* 387:1531–1539.
- Carvalho BL, Germano LRN, Braga KML, Araújo ERF, Rocha DA, Obara MT 2020. Susceptibility of *Aedes aegypti* populations to pyriproxyfen in the Federal District of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 53:e20190489.
- Carvalho RG, Lourenço-de-Oliveira R, Braga IA 2014. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Mem Instit Osw Cruz* 109:787-796.
- Cauchemez S, Besnard M, Bompard P, Dub T, Guillemette-Artur P, Eyrolle-Guignot D, et al 2016. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–2015: A retrospective study. *Lancet* 387:2125–2132.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention 2010. Guideline for evaluating insecticide resistance in vectors using the CDC bottle bioassay. Atlanta, USA. Disponível em: <[https://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/ir\\_manual/ir\\_cdc\\_bioassay\\_en.pdf](https://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/ir_manual/ir_cdc_bioassay_en.pdf)>. Acesso em: 15 Mar 2023.

Chediak M, Pimenta Jr FG, Coelho GE, Braga IA, Lima JBP, Cavalcante KRLJ, et al 2016. Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Osw Cruz* 111(5):311-321.

Chen TY, Smartt CT, Shin D 2021. Permethrin resistance in *Aedes aegypti* affects aspects of vectorial capacity. *Insects* 12:71.

Contevelle LC, Zanella L, Marin MA, Filippis AM, Nogueira RM, Vicente AC, et al 2016. Phylogenetic analyses of chikungunya virus among travelers in Rio de Janeiro, Brazil, 2014–2015. *Mem Inst Osw Cruz* 111(5):347–348.

Couderc T, Gangneux N, Chretien F, Caro V, Le Luong Tan, Ducloux B, et al 2012. Chikungunya virus infection of corneal grafts. *J Infect Dis* 206(6):851–859.

Cunha MDP, Duarte-Neto AN, Pour SZ, Hajjar LA, Frassetto FP, Dolhnikoff M, et al 2021. Systemic dengue infection associated with a new dengue virus type 2 introduction in Brazil - a case report. *BMC Infect Dis* 21(1):311.

Cunha MDP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D 2005. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Osw Cruz* 100(4):441-4.

David JP, Ismail HM, Chandor-Proust A, Paine MJI 2013. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philos T Roy Soc B* 368:20120429.

Deng J, Guo Y, Su X, Liu S, Yang W, Wu Y, et al 2021. Impact of deltamethrin-resistance in *Aedes albopictus* on its fitness cost and vector competence. *PLoS Negl Trop Dis* 15:e0009391.

Diallo M, Thonnon J, Traore-Lamizana M, Fontenille D 1999. Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. *Am J Trop Med Hyg* 60:281–6.

Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ 1952. Zika virus. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 46:509–520.

Dick OB, San Martin JL, Montoya RH, del Diego J, Zambrano B, Dayan GH 2012. The History of Dengue Outbreaks in the Americas. *Am J Trop Med Hyg* 87(4):584-93.

Diniz DFA, de Melo-Santos MA, Santos EMM, Beserra EB, Helvecio E, de Carvalho-Leandro D, et al 2015. Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. *Parasites Vectors* 8:662.

Domingo, E., C. Escarmís, L. Menéndez-Arias, C. Perales, M. Herrera, I. S. Novella, and J. J. Holland. 2008. Chapter 4 - Viral quasispecies: dynamics, interactions, and pathogenesis. *In: Origin and evolution of viruses: 87-118.*

Dong K 2007. Insect sodium channels and insecticide resistance. *Depart Entomol* 7:17–30.

Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al 2009. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 360:2536–2543.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control 2015. Rapid risk assessment: Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome – 10 December 2015. Disponível em: < <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-zika-virus-epidemic-americas-potential-association>>. Acesso em: 15 Mar 2023.

Excler JL, Saville M, Berkley S, Kim JH 2021. Vaccine development for emerging infectious diseases. *Nat Med* 27:591-600.

Faria ABC 2009. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo integrado de pragas florestais. *Ambiência* 5(2):345-358.

Faria NR, Azevedo RSDS, Kraemer MUG, Souza R, Cunha MS, Hill SC, et al 2016. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* 352:345–349.

Faria NR, Quick J, Claro IM, Thézé J, de Jesus JG, Giovanetti M, et al 2017. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature* 546:406–410.

Fatta D, Canna-Michaelidou S, Michael C, Demetriou E, Christodoulidou M, Achilleos A, et al 2007. Organochlorine and organophosphoric insecticides, herbicides and heavy metals residue in industrial wastewaters in Cyprus. *J Hazard Mater* 145(1-2):169-179.

Fauci AS, Morens DM 2016. Zika virus in the Americas — yet another arbovirus threat. *N Engl J Med* 374:601–604.

Feldstein LR, Ellis EM, Rowhani-Rahbar A, Halloran ME, Ellis BR 2016. The First Reported Outbreak of Chikungunya in the U.S. Virgin Islands, 2014–2015. *Am J Trop Med Hyg* 95(4):885–889.

Ferrari JA 1996. Insecticide resistance. In: Marquardt, William C, Beaty, Barry J. *The Biology of Disease Vectors*, University Press of Colorado. Chap. 30, p.512-529.

French-Constant RH, Pittendrigh B, Vaughan A, Anthony N 1998. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *Philos T Roy Soc B* 353(1376):1685–1693.

Finney DJ 1971. Probit analysis. London: Cambridge University.

Fonseca-González IBD 2009. Variación temporal en la susceptibilidad a la infección por el virus de la dengue en *Aedes aegypti* (L) de Quibdó, Colombia. In: Biomedica, editor. Congreso de Parasitología y Medicina Tropical. Ibagué; 216–34.

Friedlander E, Steinrücken M 2022. A numerical framework for genetic hitchhiking in populations of variable size. *Genetics* 220:iyac012.

Gasperina DD, Balsamo ML, Garavaglia SD, Rovida F, Baldanti F, Grossi PA 2015. Chikungunya infection in a human immunodeficiency virus infected kidney transplant recipient returning to Italy from the Dominican Republic. *Transpl Infect Dis* 17:876–9.

Girão ES, Dos Santos BGR, do Amaral ES, Costa PEG, Pereira KB, de Araujo Filho AH, et al 2017. Chikungunya infection in solid organ transplant recipients. *Transpl Proc* 49(9):2076–81.

- Gloria-Soria A, Brackney DE, Armstrong PM 2022. Saliva collection via capillary method may underestimate arboviral transmission by mosquitoes. *Parasites Vectors* 15:103.
- Glushakova LG, Alto BW, Kim MS, Bradley A, Yaren O, Benner SA 2017. Detection of chikungunya viral RNA in mosquito bodies on cationic (Q) paper based on innovations in synthetic biology. *J Virol Methods* 246:104–111.
- Glushakova LG, Alto BW, Kim MS, Wiggins K, Eastmond B, Moussatche P, et al 2018. Optimization of cationic (Q)-paper for detection of arboviruses in infected mosquitoes. *J Virol Methods* 261:71-79.
- Goindin D, Delannay C, Gelasse A, Ramdini C, Gaude T, Faucon F, et al 2017. Levels of insecticide resistance to deltamethrin, malathion, and temephos, and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from the Guadeloupe and Saint Martin islands (French West Indies). *Infect Dis of Poverty* 6:38.
- Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Ondo SM, Jiolle D, et al 2014. Zika virus in Gabon (Central Africa) – 2007: a new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl Trop Dis*. 8:e2681.
- Gubler DJ 1997. Dengue and dengue hemorrhagic: its history and resurgence as a global public health problem. Gubler DJ, Kuno G, eds. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. London: CAB International, 1–22.
- Gubler DJ, Rosen L 1976. A simple technique for demonstrating transmission of dengue viroses by mosquitoes without the use of vertebrate hosts. *Am J Trop Med Hyg* 25:146–150.
- Gudo ES, Black JF, Cliff JL 2016. Chikungunya in Mozambique: A Forgotten History. *PLoS Negl Trop Dis* 17:10(11):e0005001.
- Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, Guzman H, Tesh RB, Weaver SC 2012. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis* 6(2):e1477.
- Halstead SB 2015. Reappearance of chikungunya, formerly called dengue, in the Americas. *Emerg Infect Dis* 21(4):557–561.
- Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al 2015. Biology of Zika virus infection in human skin cells. *J Virol* 89:8880–96.
- Harris AF, Rajatileka S, Ranson H 2010. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am J Trop Med Hyg* 83(2):277-84.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Molec Biol* 34:653–665.
- Hemingway J, Ranson H 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol* 45:371–391.
- Heukelbach J, Alencar CH, Kelvin AA, de Oliveira WK, Cavalcanti LPdG 2016. Zika virus outbreak in Brazil. *J Infect Dev Ctries* 10:116–120.
- Hills SL, Fischer M, Petersen LR 2017. Epidemiology of Zika virus infection. *J Infect Dis* 216(10):S868–74.
- Honório N 2017. Proposta metodológica de estratificação de áreas de risco para dengue, chikungunya e Zika, 2017. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz.

- Honório NA, Câmara DCP, Wiggins K, Eastmond B, Alto BW 2020. High-Throughput Method for Detection of Arbovirus Infection of Saliva in Mosquitoes *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Viruses* 12(11):1343.
- Hustedt JC, Boyce R, Bradley J, Hii J, Alexander N 2020. Use of pyriproxyfen in control of *Aedes* mosquitoes: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 14(6).
- Iwamura T, Guzman-Holst A, Murray KA 2020. Accelerating invasion potential of disease vector *Aedes aegypti* under climate change. *Nature Communications* 11(1).
- Kasprzykowski JI, Fukutani KF, Fabio H, Fukutani ER, Costa LC, Andrade BB, et al 2020. A recursive sub-typing screening surveillance system detects the appearance of the ZIKV African lineage in Brazil: Is there a risk of a new epidemic? *Int J Inf Dis* 96:579–581.
- Kawada H, Higa Y, Futami K, Muranami Y, Kawashima E, Osei JHN, et al 2016. Discovery of point mutations in the voltage-gated sodium channel from African *Aedes aegypti* populations: potential phylogenetic reasons for gene introgression. *PLoS Negl Trop Dis* 10(6):e0004780.
- Kazmi SS, Ali W, Bibi N, Nouroz F 2020. A review on Zika virus outbreak, epidemiology, transmission and infection dynamics. *J of Biol Res-Thessaloniki* 27(5).
- Koehler PG, Patterson RJ 1991. Incorporation of pyriproxyfen in a German cockroach management program. *J Econ Entomol* 84:917-21.
- Kuno G 2010. Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. *J Med Entomol* 47(6):957-71.
- Kushwah RBS, Dykes CL, Kapoor N, Adak T, Singh OP 2015. Pyrethroid-resistance and presence of two knockdown resistance (*kdr*) mutations, F1534C and a novel mutation T1520I, in Indian *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e3332.
- Labbe P, Berthomieu A, Berticat C, Alout H, Raymond M, Lenormand T, et al 2007. Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Molec Biol Evol* 24(4): 1056-67.
- Lanteri MC, Kleinman SH, Glynn SA, Musso D, Keith Hoots W, Custer BS, et al 2016. Zika virus: A new threat to the safety of the blood supply with worldwide impact and implications. *Transfusion* 56:1907–1914.
- Lau KW, Chen CD, Lee HL, Norma-Rashid Y, Sofian-Azirun M 2015. Evaluation of Insect Growth Regulators Against Field-Collected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Malaysia. *J Med Entomol* 52(2):199-206.
- Ledoux S, Gutierrez CT, Lobo NF, Murillo EM, Pérez S, Guerra R, et al 2020. The need to harmonize insecticide resistance testing: methodology, intensity concentrations and molecular mechanisms evaluated in *Aedes aegypti* populations in Central America and Hispaniola. *BioRxiv* 02.25.964270.
- Lee HL, Lime W 1989. A re-evaluation of the susceptibility of field collected *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) larvae to temephos in Malaysia. *Mosq Borne Dis Bull* 4:91–95.

Lefevre T, Gouagna LC, Dabire KR, Elguero E, Fontenille D, Renaud F et al 2009. Beyond nature and nurture: phenotypic plasticity in blood-feeding behavior of *Anopheles gambiae* s. s. when humans are not readily accessible. *Am J Trop Med* 81:1023–1029.

Lessler J, Chaisson LH, Kucirka LM, Bi Q, Grantz K, Salje H, et al 2016. Assessing the global threat from Zika virus. *Science* 353:aaf8160.

Leta S, Beyene TJ, De Clercq EM, Amenu K, Kraemer MUG, Revie CW 2018. Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Int J Infect Dis* 67: 25–35.

Lima EP, Paiva MH, de Araújo AP, da Silva EV, da Silva UM, de Oliveira LN et al 2011. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Par & Vect* 4:5.

Lima JBP 2003. *Aedes aegypti* e Anopheles neotropicais, vetores de importância médica no Brasil: aspectos básicos de biologia e controle (tese de Doutorado). Rio de Janeiro (RJ): Instituto Oswaldo Cruz.

Lima JBP, Cunha MdP, Júnior RCDS, Galardo AKR, Soares SS, Braga IA, et al 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 68:329–333.

Lima JBP, Rosa-Freitas MG, Rodovalho CM, Braga IA 2016. Field and semi-field evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* versus Temephos® in *Aedes aegypti* control. *J Health Biol Sci* 4(2):65-74.

Linss JG, Brito LP, Garcia GA, Araki AS, Bruno RV, Lima JB, et al., 2014. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasit Vectors* 15;7:25.

Liu N 2015. Insecticide resistance in mosquitoes: Impact, mechanisms, and research directions. *Annu Rev Entomol* 60:537–559.

Maciel-de-Freitas R, Avendanho FC, Santos R, Sylvestre G, Araújo SC, Lima JBP, et al 2014. Undesirable consequences of insecticide resistance following *Aedes aegypti* control activities due to a dengue outbreak. *PloS one* 9:e92424.

Macnamara FN 1954. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 48:139–145.

Macoris MdL, Andrighetti MTM, Wanderley DMV, Ribolla PEM 2014. Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the State of São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 47:5.

Macoris MdL, Martins AJ, Andrighetti MTM, Lima JBP, Valle D 2018. Pyrethroid resistance persists after ten years without usage against *Aedes aegypti* in governmental campaigns: Lessons from São Paulo State, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 30;12(3):e0006390.

Macoris MLG, Andrighetti MTM, Otrera VCG, Carvalho LR, Júnior ALC, Brogdon WG 2007. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. *Mem Inst Osw Cruz* 102(8):895-900.

- Macoris MLG, Camargo MF, Silva IG, Takaku L, Andrighetti MTM 1995. Modificação da susceptibilidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* ao temefós. *Rev Pat Trop* 24(1):31-40.
- Manjarres-Suarez A, Olivero-Verbel J 2013. Chemical control of *Aedes aegypti*: a historical perspective. *Rev Costarric Sal Pub* 22(1):68-75.
- Manrique-Saide P, Che-Mendoza A, Barrera-Perez M, Guillermo-May G, Herrera-Bojorquez J, Dzul-Manzanilla F, et al 2015. Use of insecticide-treated house screens to reduce infestations of dengue virus vectors, Mexico. *Emerg Infect Dis* 21(2):308–11.
- Maoz D, Ward T, Samuel M, Müller P, Runge-Ranzinger S, Toledo J, et al 2017. Community effectiveness of pyriproxyfen as a dengue vector control method: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 11:e0005651.
- Marano G, Pupella S, Vaglio S, Liembruno GM, Grazzini G 2016. Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and transfusion medicine. *Blood Transfus* 14:95–100.
- Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A 1969. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg* 18:411–5.
- Marcombe S, Carron A, Darriet F, Etienne M, Agnew P, Michel T, et al 2009a. Reduced efficacy of pyrethroid space sprays for dengue control in an area of Martinique with pyrethroid resistance. *Am J Trop Med Hyg* 80(5):745-751.
- Marcombe S, Darriet F, Agnew P, Etienne M, Yp-Tcha MM, Yebakima A, et al 2011. Field efficacy of new larvicide products for control of multi-resistant *Aedes aegypti* populations in Martinique (French West Indies). *Am J Trop Med Hyg* 84:1118-12.
- Marcombe S, Farajollahi A, Healy SP, Clark GG, Fonseca DM 2014. Insecticide resistance status of United States populations of *Aedes albopictus* and mechanisms involved. *PLoS ONE* 9:e101992.
- Marcombe S, Fustec B, Cattel J, Chonephetsarath S, Thammavong P, Phommavanh N, et al 2019. Distribution of insecticide resistance and mechanisms involved in the arbovirus vector *Aedes aegypti* in Laos and implication for vector control. *PLoS Negl Trop Dis* 13(12): e0007852.
- Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C, et al 2009b. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics* 26(10):494.
- Martins AJ, Ribeiro CD, Bellinato DF, Peixoto AA, Valle D, Lima JB 2012. Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. *PLoS ONE* 7:e31889.
- Mascarenhas M, Garasia S, Berthiaume P, Corrin T, Greig J, Ng V, et al 2018. A scoping review of published literature on chikungunya virus. *PLoS ONE* 13(11):e0207554.
- Mason PJ, Haddow AJ 1957. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53; na additional note on Chikungunya virus isolations and serum antibodies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 51:238–40.
- Maynard Smith J, Haigh J 1974. The hitch-hiking effect of a favorable gene. *Genet Res* 23:23–35.

- Mazzari MB, Georghiou GP 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.
- McCormack PL 2011. Spinosad in pediculosis capitis. *Am J Clin Dermatol* 12(5):349-353.
- Mídio AF, Silva ES 1995. Inseticidas-acaricidas organofosforados e carbamatos. São Paulo, SP: Roca, 84 p.
- Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JB, Braga IA, Valle D 2007. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg* 77(3):467-477.
- Moreira IM 2018. Avaliação da suscetibilidade de populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) do Distrito Federal à inseticidas e seu controle de qualidade químico (tese de Doutorado). Brasília (DF): Universidade de Brasília.
- Moreira J, Peixoto TM, Siqueira AM, Lamas CC 2017. Sexually acquired Zika virus: A systematic review. *Clin Microbiol Infect* 23:296–305.
- Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, Ng LC, Koou SY, Dufour I, et al 2017. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl Trop Dis* 11(7):e0005625.
- Mulla MS, Thavara U, Tawatsin A, Chompoonsri MZ, Su T 2003. Laboratory and field evaluation of novaluron, a new acylurea insect growth regulator, against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Vect Ecol* 28:241-254.
- Musso D 2015. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg Infect Dis* 21:1887.
- Musso D, Gubler DJ. 2016. Zika virus. *Clin Microbiol Rev* 29:487–524.
- Muthukrishnan S, Merzendorfer H, Arakane Y, Kramer KJ 2012. Chitin metabolism in insects. In: *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. San Diego: Gilbert LI Elsevier Inc p.193-235.
- Muthusamy R, Shivakumar MS 2015. Susceptibility status of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to temephos from three districts of Tamil Nadu, India. *Journ Vec Borne Dis* 52:159-65.
- Ndiath MO 2019. Insecticides and insecticide resistance. *Methods Mol Biol* 2013:287–304.
- Ng DHL, Ho HJ, Chow A, Wong J, Kyaw WM, Tan A, et al 2018. Correlation of clinical illness with viremia in Zika virus disease during an outbreak in Singapore. *BMC Inf Dis* 18(201).
- Nyari N, Maan HS, Sharma S, Pandey SN, Dhole TN 2016. Identification and genetic characterization of chikungunya virus from *Aedes* mosquito vector collected in the Lucknow district, North India. *Acta Trop* 158:117–124.
- Owusu HF, Jancaryova D, Malone D, Muller P 2015. Comparability between insecticide resistance bioassays for mosquito vectors: time to review current methodology? *Parasit Vectors* 8:357.
- PAHO. Pan American Health Organization 2015. Epidemiological alert. Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infections. Implications for public health in the Americas. Washington, DC.

- PAHO. Pan American Health Organization. 2023. PLISA Health Information Platform for the Americas. Disponível em: <<https://www3.paho.org/data/index.php/>>. Acesso em: 19 Fev 2023.
- Pareja-Loaiza PX, Varon LS, Vega GR, Gómez-Camargo D, Maestre-Serrano R, Lenhart A 2020. Mechanisms associated with pyrethroid resistance in populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from the Caribbean coast of Colombia. *PLoS ONE* 15(10):e0228695.
- Paris M, David JP, Despres L 2011. Fitness costs of resistance to Bti toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Ecotoxicology* 20:1184–1194.
- Parker-Crockett C, Connelly CR, Siegfried B, Alto B 2021. Influence of pyrethroid resistance on vector competency for Zika virus by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 58:1908–1916.
- Parra JRP, Coelho Junior A 2019. Applied Biological Control in Brazil: From Laboratory Assays to Field Application. *J Insect Sci* 19(2):1–6.
- Parra-Henao G, Coelho G, Escobar JP, Gonzalvez G, Bezerra H 2021. Beyond traditional vector control and the need for strengthening integrated vector management in Latin America. *Ther Adv Infect Dis* 27;8:2049936121997655.
- Rahman RU, Souza B, Uddin I, Carrara L, Brito LP, Costa MM, et al 2021. Insecticide resistance and underlying targets-site and metabolic mechanisms in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Lahore, Pakistan. *Sci Rep* 11:1-15.
- Ranson H, N’Guessan R., Lines J., Moiroux N., Nkuni Z, Corbel V 2011. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends in Parasitology* 27(2):91–98.
- Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR 2016. Zika virus and birth defects — Reviewing the evidence for causality. *N Engl J Med* 374:1981–1987.
- Rawlins SC, Wan JO 1995. Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides. *J Am Mosq Control Assoc* 11(1):59-65.
- Raymond M 1985. Presentation d’une programme d’analyse logprobit pour microordinateur. Cah ORSTOM. *Ser Ent Med Parasitol* 22:117–121.
- Renault P, Josseran L, Pierre V 2008. Chikungunya-related fatality rates, Mauritius, India, and Reunion Island. *Emerg Infect Dis* 14(8):1327.
- Reynolds ES, Hart CE, Hermance ME, Brining DL, Thangamani S 2017. An overview of animal models for arthropod-borne viruses. *Comp Med* 67:232–41.
- Ribeiro GdO, Gill DE, Ribeiro ESD, Monteiro FJC, Morais VS, Marcatti R, et al 2021. Adaptive evolution of new variants of dengue virus serotype 1 genotype V circulating in the Brazilian Amazon. *Viruses* 13(4):689.
- Richards SL, Byrd BD, Reiskind MH, White AV 2020. Assessing insecticide resistance in adult mosquitoes: perspectives on current methods. *Environ Hlth Insights* 14:1178630220952790.
- Rivero A, Vézilier J, Weill M, Read AF, Gandon S 2010. Insecticide control of vector-borne diseases: When is insecticide resistance a problem? *PLoS Pathog* 6:e1001000.

- Roberts SM, James RC, Williams PL 2015. Principles of toxicology: environmental and industrial applications. 2nd ed. New York. John Wiley. p. 346-353. ISBN: 9780471293217.
- Rocklov J, Quam MB, Sudre B, et al 2016. Assessing seasonal risks for the introduction and mosquito-borne spread of Zika virus in Europe. *EBioMedicine* 9:250–56.
- Rodríguez C, Terán Z, Bisset L, Ricardo L, French P, Fuentes L 2013. Efficacy of pyriproxyfen in reference strains of *Aedes aegypti* susceptible and resistant to temephos. *Rev Cuba Med Trop* 65.
- Roiz D, Wilson AL, Scott TW, Fonseca DM, Jourdain F, Mullerr P, et al 2018. Integrated Aedes management for the control of Aedes-borne diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 12(12):e0006845.
- Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, et al 2014. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections — An unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012 – 2014. *Eur Surveill* 19:20929.
- Roush RT 1989. Designing resistance management programs: how can you choose? *Pestic. Sci* 26:423-441.
- Sabino EC, Loureiro P, Lopes ME, et al 2016. Transfusion-transmitted dengue and associated clinical symptoms during the 2012 epidemic in Brazil. *J Infect Dis* 213:694–702.
- Samal RR, Kumar S 2021. Cuticular thickening associated with insecticide resistance in dengue vector, *Aedes aegypti* L. *Int J Trop Insect Sci* 41:809–820.
- Schleier III JJ, Peterson RKD 2011. Pyrethrins and Pyrethroid Insecticides. In Green Trends in Insect Control. Edited by López O, Fernández-Bolaños JG. Cambridge: *Roy Soc Chem* 94–131.
- Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IM, et al 2016. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65(3):59-62.
- Seixas G, Grigoraki L, Weetman D, Vicente JL, Silva AC, Pinto J, et al 2017. Insecticide resistance is mediated by multiple mechanisms in recently introduced *Aedes aegypti* from Madeira Island (Portugal). *PLoS Negl Trop Dis* 11(7):e0005799.
- Service MW 1997. Mosquito (Diptera: Culicidae) dispersal - the long and short of it. *J Med Entomol* 34(6):579-88.
- Silva APB, Santos JMM, Martins AJ 2014. Mutations in the voltage-gated sodium channel gene of anophelines and their association with resistance to pyrethroids – a review. *Parasites & Vectors* 7:450.
- Silva HHG, Silva IG 1999. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *Rev Soc Bras Med Trop* 32(4):349–55.
- Siqueira ASP, Praça HLF, Santos JPCd, Albuquerque HG, Pereira LV, Simões TC, et al 2022. ArboAlvo: método de estratificação da receptividade territorial às arboviroses urbanas. *Rev Saude Publica* 56.

- Slavov SN, Otaguiri KK, Kashima S, Covas DT 2016. Overview of Zika virus (ZIKV) infection in regards to the Brazilian epidemic. *Braz J Med Biol Res* 49:e5420.
- Smith LB, Kasai S, Scott JG 2016. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pestic Biochem Physiol* 133:1–12.
- Sparks TC, Dripps JE, Watson GB, Paroonagian D 2012. Resistance and cross-resistance to the spinosyns: a review and analysis. *Pestic Biochem Physiol* 102:1-10.
- Stephenson CJ, Coatsworth H, Waits CM, Nazario-Maldonado NM, Mathias DK, Dinglasan RR, et al 2021. Geographic partitioning of dengue virus transmission risk in Florida. *Viruses* 13:2232.
- Su T, Thieme J, Lura T, Cheng ML, Brown MQ 2019. Susceptibility profile of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) from Montclair, California, to commonly used pesticides, with note on resistance to pyriproxyfen. *J Med Entomol* 56(4):1047-54.
- Torres JR, Falleiros-Arlant LH, Duenas L, Pleitez-Navarrete J, Salgado DM, Castillo JB 2016. Congenital and perinatal complications of chikungunya fever: a Latin American experience. *Int J Infect Dis* 51:85–88.
- Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S 2007. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog* 3(12):e201.
- Vairo F, Haider N, Kock R, Ntoumi F, Ippolito G, Zumla A 2019. Chikungunya Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention. *Infect Dis Clin N Am* 33:1003–1025.
- Valle D, Belinato TA, Martins AJ 2015. Controle químico de *Aedes aegypti*, resistência a inseticidas e alternativas. In: Valle D, Pimenta DN, Cunha RV, editors. Dengue: Teorias e Práticas. Rio de Janeiro: Fiocruz; p. 93-126.
- Valle D, Bellinato DF, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Junior AJM 2019. Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. *Mem Inst Osw Cruz* 114: e180544.
- Valle D, Bellinato DF, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Junior AJM 2019. Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. *Mem Inst Osw Cruz* 114:e180544.
- Vézilier J, Nicot A, De Lorgeril J, Gandon S, Rivero A 2012. The impact of insecticide resistance on *Culex pipiens* immunity. *Evol Appl* 6:497–509.
- Viana-Medeiros PF, Bellinato DF, Martins AJ, Valle D 2017. Insecticide resistance, associated mechanisms and fitness aspects in two Brazilian *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*) populations. *Med Vet Entomol* 31(4):340-350.
- Villamil-Gomez WE, Rodriguez-Morales AJ, Uribe-Garcia AM, Gonzalez-Arismendy E, Castellanos JE, Calvo EP, et al 2016. Zika, dengue, and chikungunya co-infection in a pregnant woman from Colombia. *Int J Infect Dis* 51:135–138.

Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, Torre A, Ranson H 2012. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pestic Biochem Physiol. Elsevier Inc* 104(2):126-131.

Wang L, Fontaine A, Gaborit P, Guidez A, Issaly J, Girod R, et al 2022. Interactions between vector competence to chikungunya virus and resistance to deltamethrin in *Aedes aegypti* laboratory lines? *Med Vet Entomol* 1–10, (Online ahead of print).

Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, et al 2004. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Molec Biol* 13(1):1-7.

WHO. World Health Organization 2012. Handbook for integrated vector management. Geneva: WHO Library Cataloging in Publication Data.

WHO. World Health Organization 2013. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases. World Health Organization. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HTM-NTD-2013.2/>>. Acesso em: 16 Mar. 2020.

WHO. World Health Organization 2016a. Monitoring and managing insecticide resistance in *Aedes* mosquito populations. Interim guidance for entomologists. Switzerland. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/WHO-ZIKV-VC-16.1>>. Acesso em: 12 Mar. 2023.

WHO. World Health Organization 2016b. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. 2nd ed. Switzerland. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/250677>>. Acesso em: 12 Mar. 2023.

WHO. World Health Organization 2016c. Entomological Surveillance for *Aedes* spp. in the Context of Zika Virus: Interim Guidance for Entomologists. Available online: Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/WHO-ZIKV-VC-16.2>>. Acesso em 6 Fev. 2023.

WHO. World Health Organization 2023. Health Topics. Zika virus disease. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/zika-virus-disease#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/zika-virus-disease#tab=tab_1)>. Acesso em: 14 Fev 2023.

WHO. World Health Organization 2023a. List of Prequalified Vector Control Products. Disponível em: <<https://extranet.who.int/pqweb/vector-control-products/list-prequalified-vector-control-products>>. Acesso em: 16 Mar 2023.

Williamson MS, Martinez-Torres D, Hick CA, Devonshire AL 1996. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroids insecticides. *Mol Gen Genet* 252:51–60.

Wong PS, Li MZ, Chong CS, Ng LC, Tan CH 2013. *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse): a potential vector of Zika virus in Singapore. *PLoS Negl Trop Dis* 7(8):e2348.

Yan G, Chadee DD, Severson DW 1998. Evidence of genetic hitchhiking effect associated with insecticide resistance in *Aedes aegypti*. *Genetics* 148:793–800.

Yunta C, Grisales N, Nász S, Hemmings K, Pignatelli P, Voice M, Ranson H, et al 2016. Pyriproxyfen is metabolized by P450s associated with pyrethroid resistance in *An. gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol*. 78:50–57.

Zahouli JZB, Dibo JD, Diakaridia F, Yao LVA, Souza SD, Horstmann S, Koudou BG 2023. Semi-field evaluation of the space spray efficacy of Fludora Co-Max EW against wild insecticide-resistant *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* mosquito populations from Abidjan, Côte d'Ivoire. *Parasit Vectors*16(1):47.

Zanluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos CN, Luz K 2015. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110:569–572.

Zara ALSA, Santos SM, Fernandes-Oliveira ES, Carvalho RG, Coelho GE 2016. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiol Serv Saúde* 25(2):391-404.

## 9. ANEXOS

**Anexo I – Nota Informativa Nº 103 de 2017/CGPNCMD/DEVIT/SVS/MS. Informa nova proposta para as atividades de monitoramento da resistência de *Aedes aegypti* aos inseticidas utilizados pelo PNCD.**



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS  
COORDENAÇÃO-GERAL DOS PROGRAMAS NACIONAIS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DA MALÁRIA E  
DAS DOENÇAS TRANSMITIDAS PELO *Aedes*  
SRTVN Quadra 701, Via W 5 Norte, Lote D Edifício PO700 - CEP: 70719-040.  
Telefone: (61) 3315-3646

### **NOTA INFORMATIVA Nº 103, DE 2017/CGPNCMD/DEVIT/SVS/MS**

Informa nova proposta para as atividades de monitoramento da resistência do *Aedes aegypti* aos inseticidas utilizados pelo PNCD

#### **I – BREVE HISTÓRICO DO MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA**

Desde 1999 o Ministério da Saúde vem monitorando a susceptibilidade de populações de *Aedes aegypti* a inseticidas utilizados no Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), e recomendando estratégias de manejo quando necessário.

A partir dos anos 1990, a incidência de dengue aumentou consideravelmente no Brasil, como consequência da dispersão do *Ae. aegypti* no território nacional. Com os primeiros relatos de resistência do vetor aos inseticidas seguido de confirmações laboratoriais, em 1999 um grupo de técnicos do PNCD e especialistas recomendou a implantação de um processo de monitoramento da resistência do *Ae. aegypti* a inseticidas no país. Os resultados serviram como subsídio às decisões do PNCD para o manejo de inseticidas. Até o ano de 2010 os dados apresentados por meio do monitoramento demonstraram a expansão territorial e a necessidade de substituir os princípios ativos que compõem à deltametrina e temephós, inseticidas utilizados.

A presente Nota Informativa trata sobre a proposta de reestruturação das atividades do monitoramento de resistência em 145 municípios selecionados no país, prontos para serem realizados nos anos de 2017 e 2018.

## II – NOVA PROPOSTA PARA AS ATIVIDADES DE MONITORAMENTO

O grande desafio para o monitoramento da resistência das populações de *Ae. aegypti* aos inseticidas reside na logística, principalmente no processo de coleta e posterior processamento das amostras. Nesse sentido, foi firmado um convênio entre o Ministério da Saúde e o Laboratório de Fisiologia e Controle de Vetores e Artrópodes – LAFICAVE/FIOCRUZ com os seguintes objetivos:

- Produção de vídeo e cartilha instrucionais sobre a coleta, armazenamento e envio de ovos ao laboratório;
- Fornecimento de ovitrampas e palhetas para coleta de amostras aos municípios participantes;
- Realização dos ensaios de suscetibilidade das populações coletadas em campo em 145 municípios brasileiros ao pyriproxyfen, malathion, e genotipagem das mutações *kdr* V1016I e F1534C nestas populações.

O conhecimento do estado atual das populações de *Aedes aegypti* do país em relação à resistência, é fundamental e estratégico, o LAFICAVE foi escolhido para coordenar este processo de monitoramento, por ter experiência pregressa na coordenação da rede de monitoramento, além de ser vinculado à FIOCRUZ, o que facilita os procedimentos administrativos para viabilizar a proposta.

A Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública - CGLAB coordenará e orientará os laboratórios estaduais no envio das amostras coletadas em campo, auxiliando a CGPNCMD nas atividades de monitoramento da resistência. O laboratório estadual deverá sempre comunicar a CGLAB o envio das amostras ao LAFICAVE e, caso o laboratório não tenha como viabilizar o transporte, entrar em contato com a CGLAB para indicar alternativas de envio.

O monitoramento da resistência das populações de *Ae. aegypti* a inseticidas com quantidade maior de municípios e melhor distribuição espacial, pode contribuir para o manejo adequado das alternativas com base em conhecimento sobre o perfil e dos mecanismos de resistência envolvidos. Os municípios indicados para o monitoramento em 2017/2018 foram definidos, junto às Secretarias Estaduais de Saúde, considerando-se os seguintes aspectos:

- a) Distribuição espacial abrangendo todo o território brasileiro;
- b) Índices de infestação pelo vetor suficientes para realização da coleta de ovos;
- c) Histórico de transmissão de dengue importante;
- d) Regiões em fronteira com outros países;
- e) Capacidade operacional do Programa Municipal de Controle da Dengue para realizar as coletas.

A lista dos municípios selecionados para o monitoramento da resistência segue no Anexo I.

Para realização dos testes, os municípios deverão instalar ovitrampas (armadilhas de oviposição do *Aedes aegypti*) em residências selecionadas por amostragem, coletar os ovos e enviar o material ao laboratório estadual de entomologia. As armadilhas, palhetas, vídeo e cartilhas com instruções necessárias para a coleta e envio de amostras serão fornecidos pela FIOCRUZ e Ministério da Saúde. Para maior qualidade e confiabilidade dos resultados, a coleta e envio devem seguir as orientações estabelecidas.

Ressaltamos que o preenchimento das informações solicitadas na ficha que acompanha as amostras como data e local de coleta deve ser cuidadosamente observado pelos Agentes de Controle de Endemias.

As coletas de ovos foram antecipadamente programadas, junto às Secretarias Estaduais de Saúde, considerando-se o período chuvoso e a distribuição de envio de amostras no segundo semestre de 2017 e primeiro semestre de 2018. Esta programação visa não sobrecarregar o laboratório. Segue no Anexo II o calendário previsto para coletas de ovos.

O envio do material biológico ao laboratório deve ocorrer imediatamente após o término das coletas, visando evitar perda de material uma vez que após trinta dias, o índice de

eclosão pode ser prejudicado. O laboratório estadual receberá essas amostras e, por sua vez, encaminhará ao LAFICAVE/FIOCRUZ.

Os resultados dos testes realizados serão enviados à CGPNCMD/MS e CGLAB/MS para análise subsidiando a tomada de decisões quanto ao manejo de inseticidas utilizados e discussão junto ao Comitê Técnico Assessor sobre as decisões a serem tomadas.

### III- DA SOLICITAÇÃO

Para prosseguimento às ações planejadas para o monitoramento da resistência, solicitamos que as Secretarias de Saúde dos municípios selecionados manifestem oficialmente sua intenção de participação, encaminhando Ofícios às Coordenações Estadual e Nacional do Programa de Controle da Dengue na Secretaria Estadual de Saúde e no Ministério da Saúde (CGPNCMD).

Brasília, 16 de junho de 2017.



Davino Valero Mattias  
Coordenador Geral da CGPNCMD/DEVIT/SVS/MS

De acordo



João Paulo Toledo  
Diretor  
Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis



Renato Vieira Júnior  
Diretor Substituto  
Departamento de Vigilância das  
Doenças Transmissíveis

**Anexo I - Municípios selecionados para monitoramento da resistência do *Aedes aegypti* aos inseticidas**

UF	MUNICÍPIO
AC	Brasília
	Cruzeiro do Sul
	Assis Brasil
	Rio Branco
	Sena Madureira
AM	Tabatinga
	Coari
	Humaitá
	Manaus
	São Gabriel da Cachoeira
AP	Calçoene
	Macapá
	Oiapoque
	Pedra Branca do Amapari
PA	Laranjal do Jari
	Altamira
	Belém
	Itaituba
	Tucuruí
	Redenção
	Breves
	Santarém
	Xinguara
Marabá	
RO	Cacoal
	Guajará-Mirim
	Jaru
	Porto Velho
RR	Vilhena
	Boa Vista
TO	Rorainópolis
	Araguaína
	Gurupi
	Palmas
	Dianópolis

UF	MUNICÍPIO
AL	Arapiraca
	Delmiro Gouveia
	Maceió
	Santana do Ipanema
BA	Barreiras
	Taxeira de Freitas
	Brumado
	Irecê
	Itabuna
	Salvador
	Seminha
CE	Aracati
	Crateús
	Fortaleza
	Icó
	Juazeiro do Norte
MA	Quixadá
	Sobral
	Bacabal
	Balsas
	Barra do Corda
PB	Imperatriz
	São Luís
	Alagoa Grande
PE	João Pessoa
	Campina Grande
	Souza
PE	Araripina
	Garanhuns
	Palmares
	Petrolina
	Recife
	Salgueiro
Santa Cruz do Capibaribe	

UF	MUNICÍPIO
PI	Floriano
	Parnaíba
	Picos
	São Raimundo Nonato
RN	Teresina
	Mossoró
	Jardim do Seridó
	Natal
Pau dos Ferros	

UF	MUNICÍPIO
DF	Gama
GO	Cristalina
	Goiânia
	Iporá
	Jataí
	Minaçu
	Morinhos
	Posse
MS	Campo Grande
	Três Lagoas
	Corumbá
	Coxim
	Dourados
	Ponta Porã
MT	Alta Floresta
	Barra do Garças
	Água Boa
	Confresa
	Cuiabá
	Julina
	Pontes e Lacerda
	Rondonópolis
Sinop	
PR	Londrina
	Francisco Beltrão
	Paranavaí
	Maringá
Foz de Iguaçu	
RS	Quaraí
	Passo Fundo
	Santa Rosa
	Gravataí
	Santa Maria

UF	MUNICÍPIO
SC	Itajaí
	Chapecó
	São Miguel do Oeste
	Florianópolis
	Xanxerê
ES	Cachoeiro do Itapemirim
	Nova Venécia
	Aracruz
Vitória	
MG	Belo Horizonte
	Coronel Fabriciano
	Governador Valadares
	Montes Claros
	Unai
	Patos de Minas
	Teófilo Otoni
	Uberaba
	Varginha
	Juiz de Fora
RJ	Angra dos reis
	Campos dos Goytacazes
	Nova Friburgo
	Rio de Janeiro
Volta Redonda	
SE	Aracaju
	Itabaiana
	Nossa Senhora da Glória
Lagarto	
SP	São Sebastião
	Presidente Prudente
	Ribeirão Preto
	Sorocaba
	São José do Rio Preto
São Paulo	

Anexo II - Cronograma proposto para coleta de ovos de *Aedes aegypti*

REGIÃO	UF	MUNICÍPIOS	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR
N	AC	5					X					
	AM	5					X					
	AP	5			X	X	X					
	PA	9	X	X	X	X	X					
	RO	5	X	X	X	X	X					
	RR	2			X	X						
	TO	4				X	X					
NE	AL	4				X	X					
	BA	7			X	X	X					
	CE	7	X	X								
	PB	4			X	X						
	PE	7			X	X	X					
	PI	5		X								
	RN	4	X	X								
	MA	5		X	X							
SE	4				X	X						
CO	DF	2					X					
	GO	7			X	X	X					
	MS	6				X	X					
	MT	9				X	X	X				
SE	ES	4					X	X				
	RJ	5			X	X	X					
	MG	10		X	X	X	X					
	SP	6					X	X				
SUL	PR	5				X	X					
	RS	5								X	X	
	SC	5							X	X		

Memorando nº 177/2017/CGPNCMD/DEVIT/SVS/MS

Em, 16 de junho de 2017.

Ao GAB/SVS

Assunto: **Encaminha Nota Informativa nº 103/2017 CGPNCMD/DEVIT/SVS/MS.**

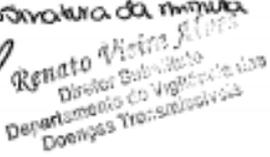
1. Encaminho Nota Informativa nº 103/2017 CGPNCMD/DEVIT/SVS/MS, informa nova proposta para as atividades de monitoramento da resistência do *Aedes aegypti* aos inseticidas utilizados pelo Programa Nacional de Controle da Dengue.

Atenciosamente,

  
Divino Valero Martins  
Coordenador da CGPNCMD/DEVIT/SVS/MS

De acordo *encaminha-se os protocolos para assinatura da minuta*

  
João Paulo Toledo  
Diretor  
Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis

  
Renato Vieira Alves  
Diretor Substituto  
Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis

**Anexo II – Metodologia para amostragem de *Aedes aegypti* por meio de armadilhas de postura (ovitampas)**

# METODOLOGIA PARA AMOSTRAGEM DE *Aedes aegypti* POR MEIO DE ARMADILHAS DE POSTURA (OVITAMPAS)



**IOC**  
Instituto Oswaldo Cruz

 Ministério de Saúde  
Secretaria  
Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

 Ministério  
da Ciência,  
Tecnologia e  
Inovação

 BRASIL

# Índice

Introdução .....	3
Qual é a metodologia do projeto? .....	4
Como as armadilhas serão distribuídas pelos municípios? .....	4
Como montar a armadilha? .....	5
Como deve ocorrer a atuação em campo? .....	6
Como preparar o material para envio por correio? .....	8
Como os dados são consolidados e divulgados? .....	9
Contato .....	9

# 1 - Introdução

Nós temos acompanhado - e alguns vivenciado - o grande problema de saúde pública causado pelos vírus dengue, Zika e chikungunya. Enquanto não tivermos uma vacina eficiente contra estes arbovírus, a principal forma de combate é controlar o vetor das três doenças: o mosquito *Aedes aegypti*.

A mais importante medida de controle do mosquito é eliminar os criadouros, os locais que o *Aedes* busca para pôr os seus ovos. Como uma medida complementar de controle, em casos de epidemia, recomenda-se o uso de um larvicida (atualmente utiliza-se o pyriproxyfen) ou de um adulticida (atualmente utiliza-se o malathion). Esses produtos devem ser utilizados com critério, porque o uso contínuo pode selecionar populações de mosquitos resistentes, ou seja, que não morrem com o inseticida.



A resistência do mosquito *Aedes aegypti* a inseticidas é o foco da pesquisa.

Um dos objetivos das nossas pesquisas na Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, é estudar a resistência a inseticidas das populações de mosquito em cada região do Brasil, com o intuito de desenvolver estratégias de uso eficientes e seguras. O Ministério da Saúde já realiza, por exemplo, a rotação de inseticidas, isto significa usar por até 5 anos um produto e trocar por outro (de preferência de classe e mecanismo de ação diferente do que estava sendo usado) que também sirva para combater aquela população de mosquito. Por isso, o monitoramento da resistência a um determinado inseticida é tão importante.

Para estudar a resistência, é preciso coletar ovos de *Aedes aegypti* de diversos municípios em cada região brasileira. Por isso, contamos com a participação dos estados e, principalmente, dos municípios, que são os responsáveis diretos pela coleta dos ovos.

Esta apostila tem o objetivo de apresentar o projeto e explicar a metodologia de coleta dos ovos de mosquitos, que serão enviados para a análise em laboratório. Este produto acompanha um vídeo em que todos os procedimentos são apresentados de forma detalhada.

Sem a contribuição de vocês, essa pesquisa não seria possível.  
Muito obrigado!

José Bento Pereira Lima,  
pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) e coordenador do projeto

## 2 - Qual é a metodologia do projeto?

Como nosso objetivo é entender a resistência dos mosquitos aos inseticidas por todo o país, nós contamos com a ajuda de profissionais da estatística para selecionar os municípios que poderiam representar cada região do Brasil. Foram escolhidos 143 municípios. O principal critério foi a localização geográfica, para fazer a cobertura do território brasileiro. Por isso, nem sempre o município escolhido é o mais importante epidemiologicamente naquela região.

Nesta primeira etapa, será realizada a coleta de ovos de mosquitos *Aedes* em cada um destes municípios. Estes ovos serão utilizados para realizar os ensaios de avaliação de resistência em laboratório.

## 3 - Como as armadilhas serão distribuídas pelos municípios?

As armadilhas usadas na nossa pesquisa são as ovitrampas, que foram desenvolvidas especialmente para coletar os ovos do mosquito.

O número de armadilhas instaladas em cada município varia de acordo com o número de imóveis que ele possui:

Número de imóveis no município	Número de ovitrampas a serem instaladas
Até 50.000	100
De 50.000 a 200.000	150
De 200.000 a 500.000	200
Mais de 500.000	300

Para fazer a distribuição das armadilhas pelos municípios, deve-se dividir o número de quarteirões do município pelo número de ovitrampas a serem instaladas.

*Exemplo: município com 40.000 imóveis e 2.000 quarteirões. Pelo número de imóveis, sabemos que devem ser instaladas 100 ovitrampas (ver tabela). Dividindo o total de quarteirões (2.000) pelo número de ovitrampas (100), o resultado é 20. Assim, devemos instalar uma armadilha a cada 20 quarteirões.*

## 4 - Como montar a armadilha?

### O kit de instalação da armadilha contém:

- 1 vaso plástico de cor preta, com aproximadamente 800mL;
- 1 paleta de compensado de madeira (tipo Eucatex) de 3cm x 12cm;
- 1 clipe de metal;
- levedo de cerveja.

### Montagem da ovitrampa:



1

As paletas exigem uma preparação que deve começar 2 dias antes da montagem da armadilha no campo. É preciso deixar as paletas de molho na água comum, de torneira, para retirar os resíduos e restos de serragem. Depois de 24 horas de molho, deve-se deixar as paletas secarem completamente. O ideal é colocá-las em uma bacia, sobre um papel toalha, por cerca de 24 horas.



2

As ovitrampas devem ser adequadamente identificadas com uma etiqueta, para evitar que a armadilha seja utilizada para outra finalidade. Cada ovitrampa deve conter um número exclusivo, que estará anotado na etiqueta, onde deve constar ainda o logo do município e uma frase orientando os moradores a não mexerem na armadilha (exemplo: Por favor, não mexa!).

A paleta também deve ser identificada. É preciso colocar uma tira de fita crepe na extremidade da paleta e ali anotar o código do município (é o código fornecido pelo IBGE), a data de instalação e o número da ovitrampa correspondente. É muito importante que a paleta receba o mesmo número da ovitrampa em que foi colocada.



3

Para a montagem da ovitrampa, a paleta deve ser fixada na borda do vaso com o clipe de metal. Um dos lados da paleta é mais áspero que o outro, para facilitar a fixação dos ovos no momento da postura. Por isso, essa parte áspera precisa ficar exposta, voltada para dentro do vaso.



4

Para atrair as fêmeas dos mosquitos para a armadilha, é preciso colocar no fundo uma solução de levedo de cerveja em concentração de 0,04%.

**Como preparar a solução:**

- colocar 6 g de levedo de cerveja em um tubo Falcon com capacidade para 50 ml;
- colocar água da torneira no tubo até que a solução atinja a marca de 50ml, misturando com o auxílio de uma pipeta ou um palito de madeira, evitando agitar para não formar espuma;
- manter a solução em frasco fechado durante o transporte até o local de instalação da armadilha.



5

O local de instalação deve ser escolhido de acordo com os seguintes critérios:

- no pendomêlio, ou seja, no entorno das casas;
- preferencialmente em uma altura de até 80 cm (caso não seja possível, o máximo aceitável deve ser de 120cm);
- ao abrigo da chuva e da luz do sol;
- fora do alcance de crianças e animais domésticos;
- a armadilha não deve ser movimentada até o dia da coleta.



6

Depois de escolher o local para instalação, é preciso colocar 1ml da solução de levedo de cerveja em cada armadilha e acrescentar 300ml de água da torneira. O vaso tem furos na altura dos 300 ml, para evitar que uma quantidade maior de água se acumule. Caso não tenha um copo com graduação, o agente pode utilizar 6 medidas do copinho de café, que possui aproximadamente 50 ml.

## 5 - Como deve ocorrer a atuação em campo?

No momento de instalar a armadilha, o agente de saúde deve se apresentar ao morador, explicar o procedimento e pedir o consentimento para a instalação. Caso o morador aceite, é importante anotar todas as informações necessárias na ficha que vai acompanhar cada agente durante todo o período de coleta. Cada armadilha instalada em determinado endereço tem um número fixo, que será utilizado para

todas as paletas que forem colocadas nela. O agente deve preencher a ficha corretamente e com atenção, atualizando as informações a cada coleta realizada. O morador deve preencher e assinar o termo de consentimento autorizando a instalação da armadilha. Esse documento deve ser guardado pelo agente junto às fichas.

O agente deve escolher o local da instalação com a ajuda do morador, explicando que a armadilha deve ficar protegida do sol, da chuva e de crianças e animais. Ao fim da visita, o agente deve informar ao morador a data da próxima visita para coleta de ovos e reinstalação ou recolhimento da armadilha.

No dia de recolher as paletas, é preciso tomar cuidado para que elas permaneçam na posição vertical, com a parte identificada para cima. Isso garante que os ovos permaneçam fora do contato com a água e cheguem intactos ao laboratório. Para isso, pode-se levar um pote vazio e colocar todas as paletas recolhidas lado a lado, prendendo com o clipe, ou preparar uma caixa de isopor com uma espuma cortada no fundo, para fixar as paletas.

corretamente e com atenção, atualizando as informações a cada coleta realizada.

O agente deve escolher o local da instalação com a ajuda do morador, explicando que a armadilha deve ficar protegida do sol, da chuva e de crianças e animais. Ao fim da visita, o agente deve informar ao morador a data da próxima visita para coleta de ovos e reinstalação ou recolhimento da armadilha.

No dia de recolher as paletas, é preciso tomar cuidado para que elas permaneçam na posição vertical, com a parte identificada para cima. Isso garante que os ovos permaneçam fora do contato com a água e cheguem intactos ao laboratório. Para isso, pode-se levar um pote vazio e colocar todas as paletas recolhidas lado a lado, prendendo com o clipe, ou preparar uma caixa de isopor com uma espuma cortada no fundo, para fixar as paletas.



Ao retirar a paleta, deve-se descartar a água que restou na ovitrampa, jogando-a na terra ou no chão de cimento, para evitar que algum ovo que possa ter permanecido ali possa sobreviver. Antes de colocar uma nova paleta, é aconselhável lavar a armadilha com uma esponja para remover os ovos. A água desta lavagem também deve ser desprezada na terra para evitar a proliferação destes mosquitos.

## 6 - Como preparar o material para envio por correio?



Chegando ao laboratório, é preciso colocar as paletas recolhidas para secar durante 2 a 3 dias. Elas devem ficar dispostas em uma bacia, sem sobreposição, com a parte que contém os ovos voltada para cima. Durante este período, é importante proteger os ovos do contato com formigas. Para isso, uma boa estratégia é utilizar água para impedir que as formigas cheguem até

as paletas; no entanto, é preciso tomar cuidado para proteger as paletas da água também. Uma sugestão é preparar uma bacia cheia de água, que pode ser da torneira, e colocar duas ovitrampas com a boca virada para baixo dentro dessa bacia com água. em seguida, apoiar a bacia que contém as paletas sobre esse suporte feito com as ovitrampas, como mostra a figura ao lado.

Após a secagem das paletas, é preciso fazer a contagem dos ovos. Com o auxílio de uma lupa, basta contar quantos ovos são visualizados em cada paleta e anotar o dado na ficha, na linha correspondente àquela armadilha. Caso alguma paleta não contenha ovos, ela é considerada negativa. Dependendo do estado de conservação, a paleta negativa pode ser reaproveitada ou descartada.



Para enviar as paletas ao laboratório pelo correio, elas devem ser colocadas em uma caixa (de madeira, papelão ou isopor), com os ovos voltados para cima. É possível colocar uma camada de paletas sobre a outra, mas para isso é necessário colocar um suporte (por exemplo, varetas de madeira) entre as camadas, para que as paletas não se encostem. A última camada de paletas

deve ter os ovos voltados para baixo. Para evitar que as paletas se movimentem na caixa, é recomendável preencher as laterais com papel toalha, jornal ou papelão, bem como colocar sobre a última camada de paletas um pedaço de isopor ou de papelão. Por cima de tudo, devem ser colocados as fichas usadas no campo e os termos de consentimento assinados pelos moradores. Ao fim do processo, a caixa deve ser lacrada e enviada ao laboratório.

## 7 - Como os dados são consolidados e divulgados?

Os ensaios serão realizados pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores do Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro. Os resultados serão enviados para a Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Malária e Doenças Transmitidas pelo Aedes - CGPNCMD, que divulgará os resultados após compilação e análise dos dados.

### Contato

**Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro**

[jbento@ioc.fiocruz.br](mailto:jbento@ioc.fiocruz.br)

(21) 2590-6598

**Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Malária e Doenças Transmitidas pelo Aedes – CGPNCMD**

[kauara.campos@saude.gov.br](mailto:kauara.campos@saude.gov.br)

[roberta.carvalho@saude.gov.br](mailto:roberta.carvalho@saude.gov.br)



## Anexo IV – Carta convite para realização de pesquisa no Laboratório de Entomologia Médica da Universidade da Flórida



Institute of Food and Agricultural Sciences  
Florida Medical Entomology Laboratory

2009\* St., SE  
Vero Beach, FL 32962  
772-226-6630  
bwalto@ufl.edu

April 21, 2020

To Whom It May Concern:

I am writing to offer Ms. Kauara Brito Campos the opportunity to pursue research at the University of Florida, Florida Medical Entomology Laboratory. The research will occur from August 15, 2020 to February 14, 2021. The proposed research will complement ongoing research by Ms. Campos on insecticide resistance among Brazilian mosquito populations. Specifically, my research group will provide Ms. Campos with training in procedures to study arbovirus infection in mosquitoes.

Ms. Campos has characterized insecticide resistance among Brazilian populations of the mosquito *Aedes aegypti*. The proposed studies at UF-FMEL will investigate the influence of insecticide resistance to juvenile growth hormone pyriproxyfen on susceptibility to Zika virus infection and transmission.

Salary for this position will be paid from her current employer. I will provide funds to cover the cost of airfare for her travel as well as shipment of samples.

I look forward to the opportunity to work with you.

Please contact our Senior Secretary Mrs. Selenia McCoy (FMEL, Administrative Office, sdmccoy@ufl.edu) at your earliest convenience to complete the paperwork for this position.

Sincerely,

Barry Alto

Please sign below to indicate that you agree with these terms.

Name: Kauara Brito Campos

Signature

Date

## Anexo V – OFÍCIO N.º 37/2020/CGARB/DEIDT/SVS/MS – Apoio a pesquisa sobre resistência do *Aedes aegypti* a inseticida e competência vetorial

22/01/2020

SEI/MS - 0013150052 - Ofício



Ministério da Saúde  
Secretaria de Vigilância em Saúde  
Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis  
Coordenação-Geral de Vigilância de Arboviroses

OFÍCIO N.º 37/2020/CGARB/DEIDT/SVS/MS

Brasília, 16 de janeiro de 2020.

Ao Senhor

**GABRIEL MURICY CUNHA**

Coordenador de Doenças de Transmissão Vetorial

Diretoria de Vigilância Epidemiológica do Estado da Bahia, Secretaria de Saúde do Estado da Bahia

Centro de Atenção à Saúde Professor José Maria de Magalhães Neto, Av. Antônio Carlos Magalhães

CEP: 41820-300 - Salvador/BA

**Assunto: Apoio a pesquisa sobre resistência do *Aedes aegypti* a inseticida e competência vetorial**

Prezado Senhor,

1. O conhecimento do perfil de susceptibilidade das populações de vetores aos inseticidas utilizados em saúde pública é necessário para subsidiar decisões mais assertivas por um programa de controle de vetores. Estudos recentes apontam que a resistência dos mosquitos vetores aos inseticidas ocasiona alterações em múltiplas categorias de seus processos biológicos, assim como em sua resposta à infecção por arbovírus.

2. No sentido de incentivar a continuidade dos estudos sobre resistência do *Aedes aegypti* aos inseticidas no país, a Coordenação Geral de Vigilância das Arboviroses apoia a realização do projeto de pesquisa intitulado "Investigação da influência da resistência ao inseticida pyriproxyfen na susceptibilidade do *Ae. aegypti* à infecção e transmissão do Zika vírus" (Anexo). O estudo será conduzido pelo Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília (NMT/ UNB) em colaboração com o Laboratório de Entomologia Médica da Universidade da Flórida (FMEL/UF) e com o Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (LAFICAVE/FIOCRUZ), com o objetivo de avaliar a influência da resistência de populações brasileiras de *Ae. aegypti* ao larvicida IGR pyriproxyfen na infecção e transmissão do vírus Zika.

3. De acordo com a metodologia proposta, populações de *Ae. aegypti* de diferentes *status* de susceptibilidade ao larvicida pyriproxyfen serão experimentalmente infectadas com o vírus Zika em laboratório para que sua competência vetorial seja avaliada. Os municípios propostos para participação no estudo, definidos de acordo com os resultados do último monitoramento da resistência de suas populações de *Ae. aegypti* (2017 e 2018), são:

- Municípios com resistência detectada ao larvicida: Itabuna, Brumado e Serrinha provenientes da Bahia; Quixadá, Icó e Juazeiro do Norte do Ceará,
- Município com susceptibilidade detectada ao larvicida: Natal/Rio Grande do Norte.

4. Para viabilizar o estudo, é necessário o auxílio dos Agentes de Controle de Endemias das Secretarias Municipais de Saúde na coleta de ovos de *Ae. aegypti* em campo. Essa coleta se dá por meio da instalação de armadilhas de oviposição em peridomicílios amostrados (entre 100 e 300 domicílios, de acordo com o tamanho do município) por duas semanas, seguida do envio do material para o LAFICAVE. A

22/01/2020

SEI/MS - 0013150052 - Ofício

metodologia de coleta é a mesma realizada no monitoramento da resistência executado em 2017 e 2018. Os insumos necessários para a coleta de ovos (ovitrampas, paletas e solução atrativa) serão fornecidos pela CGARB/MS, e os custos com envio do material coletado para o LAFICAVE serão cobertos pela Universidade da Flórida (FMEL/UF).

5. O acompanhamento das atividades por profissionais das equipes estaduais de controle de vetores em alguma etapa da atividade pode também ser necessário, de acordo com estrutura ou experiência das equipes municipais. Sugerimos que as orientações para os agentes participantes da coleta de amostras seja realizado por meio do vídeo "Metodologia para coleta de ovos *Aedes aegypti*", produzido pelo LAFICAVE e disponível no Canal IOC da plataforma You Tube (<https://www.youtube.com/watch?v=2w89kagSOKM&t=959s>).

6. Informamos ainda que os resultados provenientes do estudo serão divulgados aos participantes das SMS e SES por meio de relatórios após geração e análise estatística dos dados, para que possam subsidiar as discussões de seus possíveis impactos junto aos Programas de Controle das Arboviroses. Da mesma forma, tais informações serão publicizadas no meio científico e para a sociedade.

7. Foi previsto um cronograma para realização das atividades propostas entre janeiro de 2020 e junho de 2021, de acordo com o quadro abaixo:

Atividades previstas	2020				2021
	Jan/fev	fev/mar	abr/out	nov/dez	Jan/jun
Coleta de populações	X				
Criação da geração F1 em laboratório e exportação das amostras		X			
Treinamento em técnicas laboratoriais e realização dos ensaios			X		
Análise dos dados				X	
Envio de relatório final aos envolvidos e escrita de artigo para publicação					X

8. Solicitamos o apoio das Secretarias Estaduais de Saúde no sentido de repasse das informações e de apoio às Secretarias Municipais participantes na realização das atividades de coleta de ovos e envio do material para realização do estudo. Dúvidas podem ser enviadas para os e-mails [arboviroses@saude.gov.br](mailto:arboviroses@saude.gov.br) e [kauara.campos@saude.gov.br](mailto:kauara.campos@saude.gov.br).

Agradecemos desde já pela colaboração.

Atenciosamente,

NOELY FABIANA OLIVEIRA DE MOURA  
Coordenadora-Geral de Vigilância de Arboviroses -Substituta

Documento assinado eletronicamente por **Kauara Brito Campos**, Analista Técnico de Políticas Sociais, em 22/01/2020, às 12:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do

22/01/2020

SEI/MS - 0013150052 - Ofício



[Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#); e art. 8º, da [Portaria nº 900 de 31 de Março de 2017](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.saude.gov.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.saude.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0013150052** e o código CRC **8C7010AF**.

Referência: Processo nº 25000.007093/2020-86

SEI nº 0013150052

Coordenação-Geral de Vigilância de Arboviroses - CGARB  
SRTV 702, Via W5 Norte - Bairro Asa Norte, Brasília/DF, CEP 70723-040  
Site - [saude.gov.br](http://saude.gov.br)

### Anexo VI – Licença para exportação de amostras

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - IBAMA INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA SCEN Trecho 2 - Est. Sede - Caixa Postal nº 38670 - CEP 70815-900 - Brasília-DF		INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA	1) Pag. Nº 1/1 2) Data Emissão/Issuing Date: 27/04/2021 3) Válido Até/Valid Until: 27/10/2021				
4) Licença nº/Permit n°: <b>21BR036554/DF</b>	6) Selo nº/Stamp n°: ***** 7) Selo/Stamp 	8) Controle/Check #: WJBQ1EE91V769GXG 9) Autoridade Adm. Emitente/Issuing Management Authority  Assinatura/Signature					
5) Licença de/Permit for <b>Exportação/Export</b>							
10) Importador/Importer Barry Wilmer Alto Florida Medical Entomology Laboratory, 200 9th Street S.W., Vero Beach, Florida - 32962 fone: - Estados Unidos da América - US		11) Exportador(Re-exportador)/Exporter(Re-exportar) KAUARA BRITO CAMPOS RUA 1 (ACAMP DFL) BRASÍLIA - 70803100 fone: 55618233221 - kauaraveterinaria@yashoo.com.br Brasil - BR					
12) País Importador/Country of Import Estados Unidos da América - US		13) País Exportador(Re-exportador)/Country of Export(Re-export) Brasil - BR					
14) Objetivo da Operação/Purpose of the transaction S - Científico/Fins científicos...							
15) Condições Especiais/Special Conditions For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport and preparation for shipment of live wild animals and plants or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations.							
16) Dados do Transporte/Transportation Data Local/Place: ALF/Al Brasília Data Provável/Probable Date: 01/07/2021 ESTA LICENÇA É VÁLIDA SOMENTE PARA UMA OPERAÇÃO! THIS PERMIT OR CERTIFICATE IS ONLY VALID FOR ONE SHIPMENT.							
17) Item 20) Espécie: nome científico nome vulgar/ Species: scientific name common name		18) Produto/Product 22) Descrição: Parte Quantidade-Unidade-Marcacão Description: Part Quantity-Unit-Mark					
21) Anexo/Origem Appendix/Source		19) Quantidade-Unidade Médica/Quantity Unit 23) Cód. País de Origem-Comprovante-Data Country of Origin-Permit-Data 24) Cód. País de reexportador-Certificado-Data Country reexportation-Certificate-Data					
17) I 20) 1. <i>Aedes aegypti</i> Mosquito		18) OVO/EGG 22) ovo/egg 5.000,00 UN -					
21) NC   W		19) -- 5.000,00 UN -- 23) - - 24) - -					
----- Fim dos Itens/Items End -----							
<p>"Esta licença não autoriza o uso do material biológico para acessar informações de origem genética, contida no todo ou em parte de espécime vegetal, fungo, microbiano ou animal; ou substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições <i>in situ</i>, inclusive doméstica, ou mantidos em coleções <i>in situ</i>, desde que coletados em condições <i>in situ</i>, no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre o conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial"</p> <p>"This permit does not extend to the use of biological material to access genetic information, contained in the whole or parts of plants, fungus, microorganisms or animals specimens; in substances derived from the metabolism of these living beings or from extracts obtained from live or dead specimens, occurring <i>in situ</i> conditions, including domestic ones, or kept in ex situ collections, if obtained <i>in situ</i> conditions, in national territory, the continental shelf or the exclusive economic zone, aiming at prospecting for identification of components of the genetic patrimony and/or information about associated traditional knowledge with potential commercial use."</p>							
25) Endosso da Aduana/Customs Endorsement <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%;">Item</th> <th style="width: 10%;">Qtd./Qty</th> </tr> <tr> <td>11</td> <td></td> </tr> </table> <p style="text-align: center;">ASSINAT/SIGNATURE _____</p>				Item	Qtd./Qty	11	
Item	Qtd./Qty						
11							
1 Verificar/Verify: <a href="http://ibama.gov.br/cites/verificar">http://ibama.gov.br/cites/verificar</a> E-mail: <a href="mailto:cites.sede@ibama.gov.br">cites.sede@ibama.gov.br</a> 1ª Via - Original - Importador   Exportador - Brasil   Importer   Exporter - Brazil 2ª Via - Exportador   Importador - Estrangeiro   Exporter   Importer - Other Country 3ª Via - Aduana / Customs 4ª Via - IBAMA							

## Anexo VII – Documento de permissão para importação e transporte de vetores nos Estados Unidos

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE VETERINARY SERVICES RIVERDALE, MARYLAND 20737 <b>UNITED STATES VETERINARY PERMIT FOR IMPORTATION          AND TRANSPORTATION OF CONTROLLED MATERIALS AND          ORGANISMS AND VECTORS</b>	PERMIT NUMBER 610-21-124-00288 PERMIT CATEGORY Research
NAME AND ADDRESS OF SHIPPER(S) Kauara Brito Campos Ministerio da Saude, Secretaria de Vigilância em Saude-Setor SRTVN Quadra 701 Lote D, Asa Norte Brasilia, Brazil 70719040 7725841079	DATE ISSUED 05-04-2021 DATE EXPIRES 05-04-2022
NAME AND ADDRESS OF PERMITTEE INCLUDING ZIP CODE AND TELEPHONE NUMBER Barry Alto 200 9th St. S.E. Vero Beach, FL 32968 (772) 584-1079	U.S. PORT(S) OF ARRIVAL Any U.S. Port(s) MODE OF TRANSPORTATION Air

AS REQUESTED IN YOUR APPLICATION, YOU ARE AUTHORIZED TO IMPORT OR TRANSPORT THE FOLLOWING MATERIALS

Mosquito eggs (*Aedes aegypti*)

### RESTRICTIONS AND PRECAUTIONS FOR TRANSPORTING AND HANDLING MATERIALS AND ALL DERIVATIVES

THIS PERMIT IS ISSUED UNDER AUTHORITY CONTAINED IN 9 CFR CHAPTER 1, PARTS 94, 95 AND 122. THE AUTHORIZED MATERIALS OR THEIR DERIVATIVES SHALL BE USED ONLY IN ACCORDANCE WITH THE RESTRICTIONS AND PRECAUTIONS SPECIFIED BELOW (ALTERATIONS OF RESTRICTIONS CAN BE MADE ONLY WHEN AUTHORIZED BY USDA, APHIS, VS).

- Adequate safety precautions shall be maintained during shipment and handling to prevent dissemination of disease.
- With the use of this permit I, Barry Alto, Permittee, acknowledge that the regulated material(s) will be imported/transported within the United States in accordance with the terms and conditions as are specified in the permit. The Permittee is the legal importer/recipient [as applicable] of regulated article(s) and is responsible for complying with the permit conditions. The Permittee must be at least 18 years of age and have and maintain an address in the United States that is specified on the permit; or if another legal entity, maintain an address or business office in the United States with a designated individual for service of process; and serve as the contact for the purpose of communications associated with the import, transit, or transport of the regulated article(s). \*\*Note:

continued on subsequent page(s)...

TO EXPEDITE CLEARANCES AT THE PORT OF ENTRY, BILL OF LADING, AIRBILL OR OTHER DOCUMENTS ACCOMPANYING THE SHIPMENT SHALL BEAR THE PERMIT NUMBER

SIGNATURE {{esl:Signer1:Signature}}	TITLE VETERINARY MEDICAL OFFICER	NO. LABELS
--	-------------------------------------	------------

## ATTACH TO U.S. VETERINARY PERMIT- 610-21-124-00288

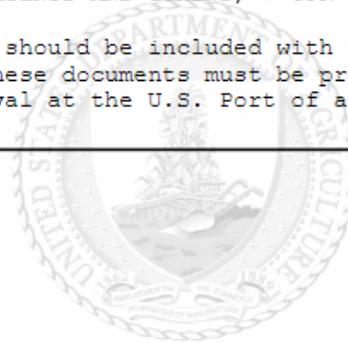
Import/Permit requirements are subject to change at any time during the duration of this permit.

- \*\*\*Materials shall be consigned directly to the permittee address specified above.
- \*\*\*Each shipment shall be accompanied by an ORIGINAL document from the producer confirming that the exported mosquito eggs: 1) are from mosquitoes field-caught in Brazil; 2) have not been infected with any disease pathogens; and 3) were not exposed to any animal origin materials. [This certification must CLEARLY correspond to the shipment by means of an invoice number or shipping marks or lot number or other identification method. An English translation must be provided.]
- All studies must be conducted in ACL2 level facilities located in the Florida Medical Entomological Laboratory , rooms Anteroom 111A, ABSL2 room 111B, and insectary 110, which have been inspected and approved by the USDA. These facilities shall be reinspected every 3 years.
- Importing facility is subject to routine inspection by USDA, APHIS personnel during normal business hours to ensure compliance with permit restrictions.
- It is incumbent upon the permittee to uphold proper biosafety procedures and protocols to protect human and animal health as per institutional policy and recommendations published in Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, current edition.
- The imported material must be shipped by a commercial courier with tracking capabilities. Hand-carried material is subject to confiscation and destruction.
- This permit DOES NOT authorize direct or indirect exposure of or inoculation into laboratory and domestic livestock, (including but not limited to: birds/poultry, cattle, sheep, goats, swine, and/or horses).
- Materials, derivatives, packaging, containers, and all equipment in contact with the imported products shall be sterilized or considered a biohazard and disposed of accordingly.
- Imported materials (including hand-carried material) may be subject to regulations enforced by US Customs and Border Protection (CBP). Please visit their website <http://cbp.gov/biologicals>.
- Work with the permitted material shall be performed in accordance with the condition requirements described in this permit. Subsequent distribution to another state is prohibited without prior authorization of APHIS (in the form of an interstate transport permit, written correspondence, or reference to an applicable guideline for no import permit required). Any change in use, treatment, disposal, and distribution within the state may require approval from the state and/or local government.
- The restrictions on this permit remain in force as long as the material is in the United States.
- This permit does not exempt the permittee from responsibility for compliance with any other applicable federal, state, or local laws and regulations.

SIGNATURE {{esl:Signer1:Signature}}	TITLE VETERINARY MEDICAL OFFICER	NO. LABELS
--	-------------------------------------	------------

## ATTACH TO U.S. VETERINARY PERMIT- 610-21-124-00288

- This permit shall not be used to transport or import of any select agents (HHS AND USDA SELECT AGENTS AND TOXINS, 7 CFR Part 331, 9 CFR Part 121, and 42 CFR Part 73).
- A copy of this permit should be included with the shipping documents. For imported materials, these documents must be presented to CBP Agricultural Specialists upon arrival at the U.S. Port of arrival.



SIGNATURE {{esl:Signer1:Signature}}	TITLE VETERINARY MEDICAL OFFICER	NO. LABELS
--	-------------------------------------	------------

## **Anexo VIII – Protocolo para replicação de células Vero, propagação e titulação viral (ensaio de placa)**

### **A) Replicação de células Vero para manutenção em laboratório, utilização em propagação e titulação virais**

- (1) Garanta que as células Vero a serem utilizadas estejam pelo menos 80% confluentes, quando vistas ao microscópio, para manutenção celular em laboratório (ideal que estejam 100% confluentes para replicação e titulação virais);
- (2) Prepare um recipiente de descarte com hipoclorito de sódio;
- (3) Despeje ou remova qualquer meio residual do frasco de células Vero no recipiente de descarte (as células soltas ou não confluentes estão mortas, por isso devem ser descartadas);
- (4) Adicione 4 ml de Tripsina-EDTA 0,25% (concentração da solução de trabalho) ao frasco de células (T-175), balance suavemente o frasco para frente e para trás para garantir o contato da Tripsina com todas as células Vero existentes no frasco e coloque o frasco em uma incubadora a 37 °C por 3 minutos;
- (5) Triture as células Vero (pipetando suavemente o líquido para cima e para baixo, na parede do frasco) para remover quaisquer células aderentes adicionais. O acréscimo de tripsina e o procedimento de trituração permitem que as células se separem umas das outras e das paredes do frasco;
- (6) Adicione 21 ml de meio de cultura fresco completo<sup>1</sup> ao frasco com células (nº 5): volume total de líquido (25 ml) = 4 ml de tripsina + 21 ml de meio. Triture novamente (pipetando suavemente o líquido para cima e para baixo) para misturar bem as células, tripsina e meio;
- (7) Adicione 21 ml de meio fresco completo a um novo frasco de células (T-175). Adicione 4 ml da mistura de células, tripsina e meio de cultura (preparado no nº 6); coloque o novo frasco em uma incubadora a 37 °C

com 5% de CO<sub>2</sub> até atingir mais de 80-90% de confluência, o que leva em torno de 4 a 5 dias.

<sup>1</sup>Meio fresco completo: preparada anteriormente e mantida em refrigeração uma mistura de meio de cultura (440 ml de meio M199) + antibiótico (10 ml de penicilina com estreptomicina) + antifúngico (1 ml de fungizone) + 50 ml FBS (fetal bovine serum, sigla na língua inglesa, que provê nutrição celular).

### ***Contagem de células da suspensão via hemocítmetro:***

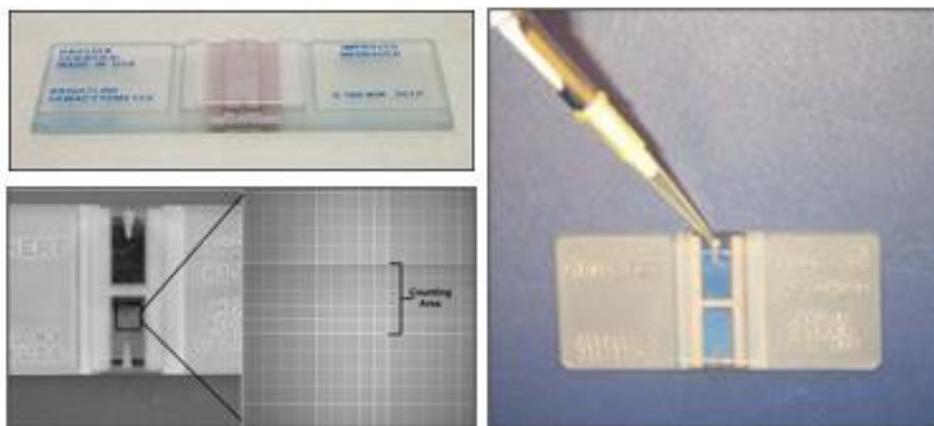


Figura 1. Hemocítmetro para estimativa de quantitativo de células

Fonte: <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/hemacytometer.html>.

### ***Cálculo para se estimar a quantidade de células Vero/ml existente no frasco:***

- (1) Limpe o hemocítmetro e a lamínula com uma pequena quantidade de etanol 70% e seque com papel para lentes, encaixe a lamínula no hemocítmetro;
- (2) Triture as células para suspender uniformemente e aplique uma gota (cerca de 15 microlitros) da suspensão de células em cada câmara do hemocítmetro, deixando-as encher por ação capilar;
- (3) Começando com a primeira câmara, conte todas as células no quadrado central de 1 mm e cada um dos quatro cantos do quadrado de 1 mm (Fig. 2);

Por exemplo:

Total de células no quadrado nº 1 = 93

Total de células no quadrado nº 2 = 91

Total de células no quadrado nº 3 = 85

Total de células no quadrado nº 4 = 81

Total de células no quadrado nº 5 = 95

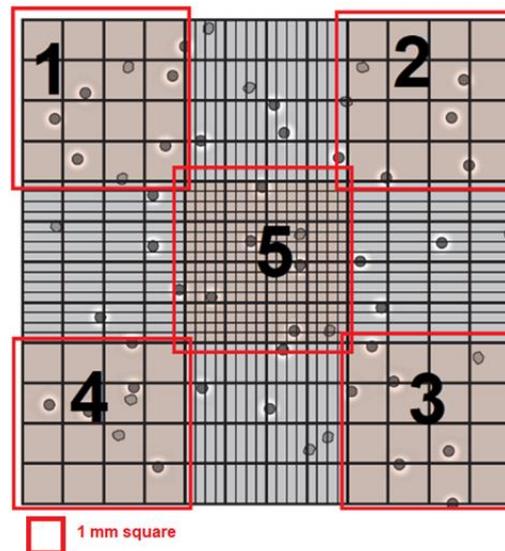


Figura 2. Contando células com um hemocitômetro

(4) Divida por 5 (nº total de quadrados) para obter o número médio de células por 1 mm<sup>2</sup> de suspensão:

$$\begin{aligned} \text{Células/ml} &= \text{n}^\circ \text{ médio de células por } 1 \text{ mm}^2 \times 10^4 = 445/5 \times 10^4 = \\ &89 \times 10^4 = \mathbf{8,9 \times 10^5} \end{aligned}$$

## B) Preparação de monocamada na placa

(1) Cálculo das quantidades de suspensão celular e meio a serem adicionados em cada poço (placa de 12 poços):

$(1,2 \times 10^5) / 8,9 \times 10^5 = \mathbf{0,134 \text{ ml}}$  de suspensão celular necessária (quantidade de suspensão que possui  $\mathbf{1,2 \times 10^5}$  células a ser colocado em cada poço da placa);

²O plaqueamento a  $1,2 \times 10^5$  células/ml é geralmente apropriado para uso no dia seguinte, enquanto  $6 \times 10^4$  células/ml é adequado para uma incubação de 2 dias.

1 ml (volume total para cada poço, em placas com 12 poços) –  $0,134 \text{ ml} = \mathbf{0,866 \text{ ml}}$  de meio completo para adicionar a cada poço.

(2) Semeadura: adicione 0,134 ml da suspensão de células a cada um dos 12 poços (valor calculado anteriormente). Adicione 0,866 ml de meio completo a cada um dos 12 poços (valor calculado anteriormente). Coloque a placa em uma incubadora a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> até atingir 100% de confluência.

### **C) Diluição em série de estoque viral**

- (1) Descongele rapidamente um frasco de estoque viral;
- (2) Prepare o respectivo número de tubos; cada tubo conterá 540 µL de MEM (Minimum Essential Media, sigla na língua inglesa);
- (3) Adicione 60 µl de estoque de vírus ao primeiro tubo sem tocar no meio;
- (4) Vortex para misturar;
- (5) Continue a transferência em série (60 µl para o próximo tubo, consecutivamente) até uma diluição máxima apropriada.

### **D) Inoculação de vírus**

#### **Materiais:**

- Placas de 12 poços com monocamada Vero 100% confluyente;
- Estoque viral;
- DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco, sigla na língua inglesa) contendo 5% de EquaFetal, 1% de PenStrep, 1% de L-Glutamina;
- Tubos de microcentrífuga estéreis;
- 0,25% cristal violeta em 30% metanol;
- 1% de metilcelulose em EMEM 2X (Meio Essencial Mínimo da Eagle, sigla na língua inglesa).

#### ***Preparação de revestimento de metilcelulose:***

A função da metilcelulose é impedir o grande deslocamento das células e vírus dentro dos poços, permitindo a visualização e cálculo das PFU (Unidades Formadoras de Placa, sigla em inglês) após adição do cristal violeta.

- (1) Coloque 5 g de metilcelulose em 2 garrafas de 1L;

- (2) Coloque 250 ml de água destilada (dH<sub>2</sub>O) em outras 2 garrafas de 1L. Autoclave por 15 min a 121 °C. Leve a água ao micro-ondas por 2 minutos até ferver (certifique-se de que a tampa esteja solta e fique atento para que a água não transborde);
- (3) Na cabine de biossegurança, despeje água quente na garrafa com a metilcelulose estéril. Agite a garrafa para misturar e obter o coloide suspenso e deixe a solução esfriar até cerca de 40 °C;
- (4) Prepare 2X EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium, sigla na língua inglesa) adicionando 25 ml de Equafetal, 10 ml de L-Glutamina e 10 ml de PenStrep. Isso criará meio com 5% de Equafetal, 2% de L-Glutamina e 2% de PenStrep;
- (5) Armazene a 4 °C até que o frasco de metilcelulose tenha esfriado o suficiente;
- (6) Adicione rapidamente 250 ml do EMEM preparado e resfriado a cada garrafa, despejando e agitando vigorosamente para misturar;
- (7) Armazene a 4 °C e aquecer a 37 °C antes de usar.

***Preparação de mancha de cristal violeta:***

A solução de cristal violeta é preparada a 0,25% de cristal violeta, 30% de metanol e 70% de dH<sub>2</sub>O. Para uma garrafa de 500 ml:

- Adicione 150 ml de metanol;
- Em seguida, adicione 1,25 g de cristal violeta;
- Adicione 350 ml de dH<sub>2</sub>O;
- Agite bem para misturar.

- (1) Remova as placas de cultura de células da incubadora e remova o meio presente nos poços, invertendo as placas em um recipiente de descarte com hipoclorito de sódio;
- (2) Lave a cultura de células com PBS 1x (sigla na língua inglesa para tampão de fosfato, que seria uma solução salina tamponada com fosfato), em um volume equivalente a 50-100% do volume do meio de cultura original;
- (3) Remova todo o PBS pipetando ou invertendo sobre um recipiente de resíduos com hipoclorito de sódio;

- (4) Adicione 200 µl de cada diluição de vírus a cada poço e agite suavemente para garantir uma distribuição igual;
- (5) Adicione mais 200 µL de meio a cada poço para evitar a secagem;
- (6) Incubar a 37 °C por 1 hora, balançando a placa a cada 15 minutos para evitar que as células sequem;
- (7) Aqueça o frasco de metilcelulose em banho-maria a 37 °C. Agite a garrafa de vez em quando para garantir que todo o meio esteja aquecido;
- (8) Adicione suavemente 1,5 ml de metilcelulose aquecida a cada poço, pipetando-o cuidadosamente na lateral do poço;

O conteúdo original (DMEM + vírus) é arrastado para o lado à medida que a metilcelulose é adicionada;

- (9) Coloque a tampa na placa e agite-a suavemente para homogeneizar sua distribuição;
- (10) Incubar a 37 °C por 3 dias (66 a 78 horas – idealmente 66 a 72);  
Fora desses intervalos de tempo, as placas formadas serão muito pequenas ou grandes;
- (11) Descarte o líquido dos poços invertendo a placa sobre a bandeja de resíduos e agitando;

Enxágue opcional: enxágue levemente as placas com DPBS (solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco) para remover o excesso de metilcelulose e células mortas - depende do tipo de célula usado e se as placas parecem difusas ou não bem formadas;

- (12) Adicione 1 ml de solução de cristal violeta a 0,25%, garantindo que todo o fundo do poço esteja coberto. Deixe no mínimo 30 minutos à temperatura ambiente para o processo de coloração. Cristal violeta pode ser deixado por um longo período;
- (13) Descarte o cristal violeta invertendo e agitando a placa sobre a bandeja de resíduos.

O conteúdo do recipiente de resíduos agora é considerado resíduo perigoso e deve ser descartado como tal;

- (14) Os poços agora podem ser lavados na pia com um fluxo suave de água. As placas estão limpas quando a água que sai da placa é clara. Deixe secar colocando a placa de cabeça para baixo sobre papel toalha;
- (15) Conte as placas e determine o título da seguinte forma:

Por exemplo,

$$\frac{PFU}{ml} = \frac{\text{Número de placas}}{(\text{Diluição})(\text{volume de vírus adicionado por ml})}$$

Se você colocou 200 µl de uma diluição de  $10^{-6}$  em um poço e vê 44 placas, o título desse poço é  $2,2 \times 10^8$  PFU/ml.

$$\frac{PFU}{ml} = \frac{44}{(10^{-6})(0,2ml)}$$

### Semeando Células - Células Vero para 90 a 100% de confluência

<i>Placa com 24 poços</i>	
Dias	Densidade de semeadura
1 dia	165.000
2 dias	71.000-75.000
3 dias	36.000-37.0000
<i>Placa com 12 poços</i>	
1 dia	325.000-350.000
2 dias	130.000
3 dias	70.000-71.000?

### E) Referências

- Alphavirus Plaque Assay by Alto LAB.
- McAuley AJ, Beasley DW 2016. Propagation and titration of West Nile virus on Vero cells. In: West Nile Virus 2016 (pp. 19-27). Humana Press, New York, NY.
- Counting Cells with a Hemacytometer. Disponível em: <<http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/hemacytometer.html>>. Acessado em: 19 Fev 2023.

## **Anexo IX – Protocolo de extração de RNA e PCR (mosquito e vírus) em diluente BA-1 (QIAamp Viral RNA Mini Handbook)**

### **A) Preparação do reagente de extração de RNA**

1. Prepare o RNA transportador/tampão AVL (isso precisará ser misturado todas as vezes):

(a) Adicione 310µL de Tampão AVE ao tubo contendo 310µg de RNA transportador liofilizado para obter uma solução de 1µg/µL;

(b) Verifique se houve formação de precipitado no buffer AVL. Se houver, incubar a 80°C até que se dissolva;

(c) Para 24 amostras. Em um novo tubo falcon de 15 mL, misture 13,44 mL de Buffer AVL com 134,4 µL de RNA-AVE. Misture invertendo suavemente o tubo 10 vezes (Não vortex).

•Observe que esta solução é estável a 2-8°C por 48 horas. A solução desenvolverá um precipitado a 2-8°C que deve ser redissolvido se usado novamente aquecendo a 80°C por no máximo 5 minutos.

2. Prepare o Buffer AW1, se ainda estiver na forma concentrada. Com um kit de preparação de 50 amostras, adicione 25mL de etanol (96-100%) em 19mL de concentrado AW1;

3. Prepare o Buffer AW2, se ainda estiver na forma concentrada. Com um kit de preparação de 50 amostras, adicione 30mL de etanol (96-100%) a 13mL de concentrado AW2. Com kit de preparação de 250 amostras, adicione 160mL de etanol (96-100%) a 66mL de concentrado AW2;

4. Equilibre o Tampão AVE à temperatura ambiente para eluição.

### **B) Preparação das amostras de mosquito**

1. Obtenha 24 amostras de mosquitos do freezer a -80°C e descongele (este é o número de amostras que podem ser colocadas na centrífuga);

2. Uma vez descongelados, homogeneizar os mosquitos usando o lisador de tecidos. Defina o lisador de tecido para 19,5 Hz por 3 minutos;

3. Após a homogeneização, centrifugue as amostras por 10 minutos a 13.200 rpm. Equilibre as amostras à temperatura ambiente (15-25°C).

### **C) Preparação do estoque de vírus em meio de cultura**

1. Obtenha estoque de vírus (por exemplo, ZIKV, WNV ou DENV) congelado em um criotubo de -80°C;
2. Diluição em série:
  - 2.1. Prepare e rotule o tubo de microcentrifuga de 2,0mL;
  - 2.2. Adicione 900µL de meio 199/EBSS em um tubo de 2,0mL por amostra;
  - 2.3. Após vortexar a amostra de estoque por 5 segundos, adicione 100 µL de estoque de vírus do frasco criogênico em um tubo de 2,0 mL rotulado com -1;
  - 2.4. Após vortexar a amostra rotulada com -1 por 5 segundos, retire 100µL de -1 amostra e transfira para um tubo marcado com -2;
  - 2.5. Repita até o final da diluição.

### **D) Extração de RNA**

1. Pipete 560 µl de solução tampão preparada de RNA transportador de AVL (tubo Falcon) para um tubo de microcentrifuga de 2,0 mL por amostra;
2. Adicione 140 µl de amostra de mosquito ou amostra de vírus diluído ao tubo de microcentrifuga de RNA transportador de tampão AVL;
3. Vortex por 15 segundos e incube as amostras à temperatura ambiente por 10 minutos;
4. Adicione 560 µL de etanol (96-100%) a cada amostra;
5. Vortex por 15 segundos;
6. Prepare a minicoluna QIAamp em um tubo de coleta de 2mL;
7. Aplique 630 µl de solução de amostra à minicoluna QIAamp sem molhar a borda e deixe as pontas usadas no tubo de amostra para reutilização;
8. Centrifugue a 8.000 rpm por 1 minuto;
9. Descarte o filtrado em um béquer de resíduos;
10. Repita esta etapa até que toda a solução de amostra tenha sido carregada na coluna giratória;
11. Descarte o filtrado em um béquer de resíduos;
12. Adicione 500µL de Buffer AW1 a cada minicoluna QIAamp;

13. Centrifugue a 8.000 rpm por 1 minuto;
14. Descarte o filtrado em um béquer de resíduos;
15. Adicione 500µL de Buffer AW2 a cada minicoluna QIAamp;
16. Centrifugue a 13.200 rpm por 3 minutos;
17. Descarte o filtrado em um béquer de resíduos e coloque a minicoluna QIAamp em um tubo de microcentrífuga de 1,5mL limpo;
18. Adicione 60µL de Buffer AVE à coluna QIAamp Mini sem tocar no filtro;
19. Centrifugue a 8.000 rpm por 1 minuto;
20. Imediatamente, armazene o RNA no freezer a 80°C.

\*\*Proporção de volume de tampão AVL (Buffer AVL) e transportador de RNA-AVE:

Nº. de amostras	Buffer AVL (ml)	Carrier RNA-AVL (µL)	Nº. de amostras	Buffer AVL (ml)	Carrier RNA-AVL (µL)
1	0,56	5,6	13	7,28	72,8
2	1,12	11,2	14	7,84	78,4
3	1,68	16,8	15	8,40	84,0
4	2,24	22,4	16	8,96	89,6
5	2,80	28,0	17	9,52	95,2
6	3,36	33,6	18	10,08	100,8
7	3,92	39,2	19	10,64	106,4
8	4,48	44,8	20	11,20	112,0
9	5,04	50,4	21	11,76	117,6
10	5,06	56,0	22	12,32	123,2
11	6,16	61,6	23	12,88	128,8
12	6,72	67,2	24	13,44	134,4

#### **E) Preparação de primers para qRT-PCR (criação de componentes para 69 reações LC480 qRT-PCR)**

1. Para reconstituir os primers estoque liofilizados (em pó) para fazer uma solução de 100 µM:

-Observe a quantidade de nmol no tubo e multiplique por 10 para obter a quantidade de µL de H<sub>2</sub>O a adicionar. Por exemplo, para um tubo

liofilizado que indica 39,89 nmol, você adicionaria 398,9  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  para obter sua solução final de 100  $\mu\text{M}$ .

\* Deve usar  $\text{H}_2\text{O}$  de grau molecular.

2. Para fazer primer 10 $\mu\text{M}$ :

-Use um tubo de 1,5mL para fazer a mistura: faça vários tubos, se necessário. Em seguida, faça alíquotas de 72 $\mu\text{L}$ /tubo em tubos de 0,2mL;

-A seguinte mistura rende cerca de 20 tubos de 72 $\mu\text{L}$ /tubo: 160 $\mu\text{L}$  de primer estoque 100 $\mu\text{M}$  + 1,44mL  $\text{H}_2\text{O}$ .

3. Para fazer 40 ng/L BSA:

-O tubo de estoque BSA está localizado no freezer -20°C na sala BL2 frontal;

-Use tubo de 1,5mL para fazer a mistura: 6 $\mu\text{L}$  de estoque de BSA + 1,5mL de  $\text{H}_2\text{O}$ ;

-Em seguida, prepare alíquotas de 72 $\mu\text{L}$ /tubo em tubos de 0,5mL.

## **F) Preparação de sondas (Probes) para qRT-PCR**

1. Para reconstituir a sonda estoque liofilizada (em forma de pó) para uma solução de 100  $\mu\text{M}$ :

-Observe a quantidade de nmol no tubo e multiplique por 10 para obter a quantidade de  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  a adicionar. Por exemplo, para um tubo liofilizado que indica 39,89 nmol, você adicionaria 398,9  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  para obter sua solução final de 100  $\mu\text{M}$ .

2. Para fazer sonda de 20 $\mu\text{M}$ :

-Use tubo de 1,5mL para fazer a mistura. Em seguida, prepare alíquotas de 30 $\mu\text{L}$ /tubo em tubos de 0,2mL de cor âmbar;

-A seguinte mistura faz cerca de 48 tubos de 30 $\mu\text{L}$ /tubo: 300 $\mu\text{L}$  de sonda estoque 100 $\mu\text{M}$  + 1,2mL  $\text{H}_2\text{O}$ .

3. Preparação da mistura 2X Rxn:

-O material vem com kits qRT-PCR e não precisa ser diluído. É necessário apenas alíquotar 710 $\mu\text{L}$ /tubo em tubos de 1,5mL.

### G) Protocolo Master Mix SuperScript III rt-PCR

Componente	Volume por amostra ( $\mu$ )	Volume por 102 amostras ( $\mu$ )
DEPC- água tratada	2,2	224,4
Forward Primer (10 $\mu$ M)	1,0	102,0
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	1,0	102,0
2x Rxn Mix	10,0	1020,0
Probe	0,4	40,8
Taq	0,4	40,8
Template (ex., vRNA)	5,0	
Volume total	20,0	

Exemplo:

- (1) Poço de controle positivo (Padrão) = 15  $\mu$ L Master Mix + 5  $\mu$ L de controle positivo
  - (2) Poço de controle negativo (NTC) = 15  $\mu$ L de Master Mix + 5  $\mu$ L de água tratada com DEPC
  - (3) Poços experimentais (desconhecidos) = 15  $\mu$ L de mistura principal + 5  $\mu$ L de amostra desconhecida
- Adicionar volumes maiores a menores para fazer uma mistura Master; o último componente deve ser um Probe.

### H) Protocolo qRT-PCR CFX96:

1. Clique no botão "Definido pelo usuário" no "Assistente de inicialização";
2. Clique em "Selecionar existente" ou "Criar novo" para a configuração do termociclador de PCR e, em seguida, clique no botão "Avançar";
  - (1) DENV-I: 60°C por 30 min, 95°C por 2 min, [39 ciclos a 95°C por 15 s e 60°C por 1 min] e 45°C por 1 s;
  - (2) WNV: 48°C por 20 min, 95°C por 2 min, [40 ciclos a 95°C por 10 s e 60°C por 15 s] e 40°C por 30 s;

(3) ZIKV: 94°C por 2 min, e 39 ciclos de 94°C por 15 s, 50°C por 30 min e 58°C por 1 min.

3. Clique em “Editar selecionado” para obter rótulos de amostra. Clique em “Limpar bem” com células arrastadas não necessárias para remoção. Desmarque “Opções de fluoróforo” incluindo “Quasar, Cy5, Texas, Hex” Estamos usando apenas “FAM”;
4. Altere os rótulos arrastando as células e clique na caixa “<Nenhum>” e entre;
5. Vá para “tipo de amostra” e clique no botão “Controle Negativo” para NC;
6. Clique em um dos nomes de PCR (Crick ou Watson) que você usará;
7. Mude o volume da amostra de 25µl para 20µl no caso de usar Taq;
8. Clique em "Abrir tampa" ou pressione o botão quadrado no PCR;
9. Coloque uma placa de 96 poços na máquina PCR;
10. Clique em "Fechar tampa" ou pressione o botão quadrado no PCR;
11. Clique em “Iniciar execução”.

## **I) Terminologia**

1. Tampão AVE é água livre de RNase que contém 0,04% de azida sódica como conservante para evitar o crescimento microbiano e subsequente contaminação com RNases.
2. O RNA transportador serve a 2 propósitos. Em primeiro lugar, aumenta a ligação dos ácidos nucleicos virais à membrana QIAamp Mini, especialmente se houver muito poucas moléculas alvo na amostra. Em segundo lugar, a adição de grandes quantidades de RNA transportador reduz a chance de degradação do RNA viral no raro evento em que as moléculas de RNase escapam da desnaturação pelos sais caotrópicos e detergente no Tampão AVL. Se o RNA transportador não for adicionado ao tampão AVL, isso pode levar à redução da recuperação do RNA viral.
3. Tampão AVL é um tampão de lise viral usado para purificar ácidos nucleicos virais.
4. AVL + Carrier RNA: melhoram a ligação do RNA viral à membrana QIAamp, especialmente no caso de amostras de baixo título, e limitam a possível degradação do RNA viral devido a qualquer atividade RNase residual.

5. Os tampões AW1 e AW2 (washing) são soluções de lavagem que lavam os contaminantes do DNA.
6. Minicoluna QIAamp: baseia-se num procedimento simples de ligação-lavagem-eluição. Os ácidos nucleicos são isolados dos lisados através da ligação às partículas magnéticas na presença de um sal caotrópico, que remove a água das moléculas hidratadas em solução.
7. Sondas: são oligonucleotídeos de DNA marcados com fluorescência. Eles são projetados para ligar a jusante de um dos primers durante a reação de PCR e fornecer um sinal fluorescente durante a reação.
8. Primer: serve para hibridar com o DNA da amostra e definir a região do DNA que será amplificada.
  - (1) o primer direto se liga ao códon de início do DNA molde.
  - (2) o primer reverso liga-se ao códon de parada da fita complementar de DNA.
9. Mistura 2X Rxn: contém Taq DNA Polimerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, KCl e estabilizadores.
10. Taq polimerase: a DNA polimerase normalmente usada em PCR. A bactéria tolerante ao calor da qual foi isolada (*Thermus aquaticus*). Essa estabilidade ao calor a torna ideal para uso em PCR.

## J) Referências

- You tube. TissueLyserII tutorial. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=WyP2ueiPSTc>>. Acesso em: 10 Dez 2022.
- QIAamp Viral RNA Mini Handbook. Disponível em: <[https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en&cmpid=PC\\_PCR\\_PCR\\_qiaprepamp-sales\\_0121\\_SEA\\_GA&qclid=Cj0KCQiA0eOPBhCGARIsAFIwTs6nJ-1HhWUdiBAOEsgdNERBsOEeYnLd5KSwYrx1aHMzLbOFo-ijwoagaAvoBEALw\\_wcB](https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en&cmpid=PC_PCR_PCR_qiaprepamp-sales_0121_SEA_GA&qclid=Cj0KCQiA0eOPBhCGARIsAFIwTs6nJ-1HhWUdiBAOEsgdNERBsOEeYnLd5KSwYrx1aHMzLbOFo-ijwoagaAvoBEALw_wcB)>. Acesso em: 10 Dez 2022.
- Dr. Alto Lab Protocols.

## RESEARCH

## Open Access



# Assessment of the susceptibility status of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations to pyriproxyfen and malathion in a nation-wide monitoring of insecticide resistance performed in Brazil from 2017 to 2018

Kauara Brito Campos<sup>1,2</sup>, Ademir Jesus Martins<sup>3</sup>, Cynara de Melo Rodvalho<sup>3</sup>, Diogo Fernandes Bellinato<sup>3</sup>, Luciana dos Santos Dias<sup>3</sup>, Maria de Lourdes da Graça Macoris<sup>4</sup>, Maria Teresa Macoris Andrighetti<sup>4</sup>, José Bento Pereira Lima<sup>3\*</sup>  and Marcos Takashi Obara<sup>2</sup>

## Abstract

**Background:** Chemical mosquito control using malathion has been applied in Brazil since 1985. To obtain chemical control effectiveness, vector susceptibility insecticide monitoring is required. This study aimed to describe bioassay standardizations and determine the susceptibility profile of *Ae. aegypti* populations to malathion and pyriproxyfen, used on a national scale in Brazil between 2017 and 2018, and discuss the observed impacts in arbovirus control.

**Methods:** The diagnostic-doses (DD) of pyriproxyfen and malathion were determined as the double of adult emergence inhibition (EI) and lethal doses for 99% of the Rockefeller reference strain, respectively. To monitor natural populations, sampling was performed in 132 Brazilian cities, using egg traps. Colonies were raised in the laboratory for one or two generations (F1 or F2) and submitted to susceptibility tests, where larvae were exposed to the pyriproxyfen DD (0.03 µg/l) and adults, to the malathion DD determined in the present study (20 µg), in addition to the one established by the World Health Organization (WHO) DD (50 µg) in a bottle assay. Dose-response (DR) bioassays with pyriproxyfen were performed on populations that did not achieve 98% EI in the DD assays.

**Results:** Susceptibility alterations to pyriproxyfen were recorded in six (4.5%) *Ae. aegypti* populations from the states of Bahia and Ceará, with Resistance Ratios (RR<sub>95</sub>) ranging from 1.51 to 3.58. Concerning malathion, 73 (55.3%) populations distributed throughout the country were resistant when exposed to the local DD 20 µg/bottle. On the other hand, no population was resistant, and only 10 (7.6%) populations in eight states were considered as exhibiting decreased susceptibility (mortality ratios between 90 and 98%) when exposed to the WHO DD (50 µg/bottle).

**Conclusions:** The feasibility of conducting an insecticide resistance monitoring action on a nation-wide scale was confirmed herein, employing standardized and strongly coordinated sampling methods and laboratory bioassays. Brazilian *Ae. aegypti* populations exhibiting decreased susceptibility to pyriproxyfen were identified. The local DD for malathion was more sensitive than the WHO DD for early decreased susceptibility detection.

\*Correspondence: [jbento@ioc.fiocruz.br](mailto:jbento@ioc.fiocruz.br)

<sup>3</sup> Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, Rua Francisco Manuel no 102, Bairro Benfica, Rio de Janeiro/Rio de Janeiro State CEP 20911-270, Brasil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

**Keywords:** Arboviruses, *Aedes aegypti*, Insecticide resistance, Juvenile hormones, Organophosphate insecticides

## Background

In recent decades, the incidence of *Aedes*-borne diseases, such as dengue, Zika, chikungunya and yellow fever, has increased significantly worldwide [1]. Actions against the *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) are mainly based on chemical and mechanical controls aiming to reduce infestation, while social mobilization, environmental management and legislation protections seeking to maintain environments free of larval breeding sites are also applied. Controlling the insect in its immature phases (egg, larva and pupa) is more feasible, since development occurs in specific and restricted locations, unlike the adult phase, which may be dispersed throughout various environments. The most effective form of vector control is environmental management involving mechanical reservoir removal, although arbovirus transmission blocking usually comprises chemical insecticide applications, aiming at rapidly reducing mosquito populations [2].

The Brazilian Ministry of Health (MoH) provides insecticides pre-qualified by the World Health Organization (WHO) to all Brazilian states for the chemical control of *Ae. aegypti*. This process ensures that the entire country employs trusted products concerning environmental safety, toxicity and effectiveness [3]. In addition, the Brazilian MoH evaluates all compounds under local conditions prior to purchases. The application of larvicides by public agents is recommended in domestic reservoirs that cannot be covered or eliminated, every two months. In addition, spatial insecticide application cycles are recommended whenever arbovirus transmission occurs in a given area [4]. Thus, public health actions used to control *Ae. aegypti* in Brazil consume an expressive amount of insecticides each year, considering, for example, that about 4136 Brazilian municipalities registered dengue cases from 2014 to 2017 [5].

With the intensive and continuous deployment of the same active ingredients, resistant individuals in a given population are favorably selected, potentially compromising insecticide efficacy. A rational chemical control strategy should be based on detailed knowledge concerning territorial vector distribution, susceptibility to compounds belonging to different classes and the mechanisms involved in resistance selection, in order to reduce vector infestation levels and consequent arbovirus transmission [6]. Most *Ae. aegypti* populations in America tested for DDT exhibited resistance to this compound ( $86.7 \pm 0.1\%$ ). High frequencies of resistant populations were also observed for temephos and deltamethrin ( $75.7$

$\pm 0.1\%$  and  $33 \pm 0.1\%$ , respectively). These patterns can be explained by the chronic and frequent use of these insecticides in the continent [7].

In Brazil, insecticide resistance in *Ae. aegypti* was first recorded for the organophosphate (OP) larvicide temephos in populations from the states of Goiás and São Paulo, in 1995 [8]. A few years later, a reduction in temephos resistance was detected in field studies, as well as decreased susceptibility to the adulticide OP fenitrothion and malathion in several *Ae. aegypti* populations throughout the country [9]. In 2001, resistance to the adulticide pyrethroid (PY) cypermethrin was detected in populations from the state of Rio de Janeiro [10]. Within this scenario, the National Dengue Control Programme (PNCD, Portuguese acronym) implemented the National Network for Monitoring the Resistance of *Ae. aegypti* to Insecticides (MoReNAa, Portuguese acronym) in 1999, with the purpose of providing technical support to decisions regarding the chemical control management of *Ae. aegypti*. The MoReNAa Network carried out a systematic insecticide resistance monitoring (IRM) of natural *Ae. aegypti* populations in Brazil to insecticides used in governmental campaigns, in areas considered as either priority or strategic for vector control interventions [11, 12].

Mosquito populations from about 80 cities, including those presenting the highest incidence of dengue cases, most populated, presenting high mosquito infestation indices and all state capitals, were evaluated every two years. Quantitative and qualitative bioassays for larvae and adult resistance detection were performed according to WHO and Centers for Disease Control and Prevention (CDC) methodologies. Biochemical assays for the quantification of enzymatic activity alterations and *kdr* mutation genotyping were employed to investigate the molecular basis of insecticide resistance selection and identify resistance mechanisms. The Network aided in supporting the technical decision concerning insecticide replacement until 2012, when the last monitoring round was carried out [11, 12]. Based on the increasing detection of *Ae. aegypti* populations resistant to temephos, this compound was gradually replaced by insect growth regulators (IGR) since 2009 throughout the entire country, adopting the chitin synthesis inhibitor diflubenzuron, followed by novaluron [9].

The adoption of the IGR pyriproxyfen began in 2014, based on the intention of rotating insecticides presenting distinct modes of action. As a juvenile hormone analogue, this product prolongs the immature stage of the

mosquito for up to 20 days, inhibiting the development of imaginal characteristics. A complete metamorphosis is, therefore, compromised, with mortality occurring especially at the pupal stage or leading to the emergence of malformed adults [2]. Some reports indicating resistance to IGR are available, likely because of their recent employment for public health purposes. Some alterations in susceptibility to pyriproxyfen were observed in *Ae. aegypti* populations from Martinique (RR<sub>50</sub> of 2.2, RR<sub>95</sub> of 1.9), in 2007 [13] and *Ae. albopictus* from the USA (RR<sub>50</sub> of 1.8–2.4) [14]. Higher resistance, however, was observed in *Ae. aegypti* from Malaysia (RR<sub>50</sub> of 6.1) [15] and from the USA (RR<sub>50</sub> of 38.7, RR<sub>90</sub> of 81.5), in 2015 [16].

The OP malathion began being employed against adult mosquitoes through ultra-low-volume (ULV) and residual spraying applications in Brazil in 1985. In 1989, it was replaced by fenitrothion for residual spraying, which continued to be used in ULV treatment during the following ten years, when OPs were replaced by PYs for adult control. After years without being used to control *Ae. aegypti* adults, malathion was again adopted alongside the introduction of IGRs for larval control throughout the country since 2009 [9]. OPs are derived from phosphoric acid and its homologs, and their mechanism of action acts on the inhibition of the cholinesterase enzyme [2]. Alterations in the susceptibility of *Ae. aegypti* to malathion have already been reported in countries in America, including Brazil [17, 18].

This study was developed with the aim of describing assay standardizations and resistance monitoring of *Ae. aegypti* populations to insecticides used in public health on a national scale in Brazil between 2017 and 2018, discussing the obtained findings. This monitoring was promoted by the Brazilian MoH and was the broadest evaluation ever carried out in a country of continental dimensions, resulting in the evaluation of mosquito populations from 132 cities during 17 months, in which over 137,000 larvae and 131,000 adults were tested. To the best of our knowledge, this is also the largest surveillance round concerning insecticide *Ae. aegypti* resistance monitoring on a global scale.

## Methods

### Study populations

The sampling points applied herein considered several areas throughout the Brazilian territory, covering a large number of close towns, in urban conglomerates with high population density, as suggested by Chediak et al. [19], preferentially in sites previously evaluated during the 12-year period MoReNAa Network effort, as described by Valle et al. [9]. This proposal was also adjusted considering the operational capacity of the municipal sampling

teams, resulting in the selection of 146 cities for *Ae. aegypti* samplings over the course of 17 months (Table 1, Fig. 1). Field *Ae. aegypti* populations were collected by the Endemic Control Agents of each city, using between 100 oviposition traps (ovitraps) in cities with up to 50,000 houses and 300 ovitraps in cities with over 500,000 houses, following the MoReNAa Network methodology [12].

To install the traps, houses evenly distributed in a grid pattern with full coverage of the urban territory were selected, in order to include regions presenting different infestation levels, and one trap was installed in a shaded area on the grounds of each selected house. A 0.04% yeast extract solution was used as an attractant for gravid females. In order to facilitate the preparation of this solution in the field, the agents were provided with a 50 ml conical tube containing 6 g of a commercial yeast extract (Arma Zen®; Tetra GmbH, Melle, Germany). During the trap installation, the tubes were filled with tap water to the 50 ml mark and homogenized. With the aid of plastic Pasteur pipettes, 1 ml of this solution was added to the trap, which was then filled with tap water to the 300 ml mark. The traps were maintained in the households for 15 days, with one paddle and an attractive solution change at the end of the first week. The paddles containing the eggs were air-dried for 2–3 days prior to being sent to the laboratories.

The samplings were carried out between August 2017 and December 2018, following a staggered schedule so as not to overload the laboratories. Three preferred months were chosen for the samplings in each region of the country, observing the most adequate climatic conditions in order to obtain higher egg densities. The field-collected samples were initially sent to a central entomology laboratory in each respective state, which then confirmed the correct sampling registration at the origin sites and adequate paddle storage. The paddles were then shipped to the Physiology and Arthropod Vector Control Laboratory (Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, LAFICAVE), at the Oswaldo Cruz Institute (IOC/Fiocruz), Rio de Janeiro/RJ, where the arrivals were recorded, forms were stored and populations labeled with a code known only by the study director, in order to maintain origin confidentiality. Half of the populations remained at the LAFICAVE, while the other half was sent to the Applied Entomology Laboratory (Laboratório de Entomologia Aplicada, LEnA), at the Endemic Control Superintendence (Superintendência de Controle de Endemias, SUCEN), Marília, SP. *Aedes aegypti* specimen sorting, colony maintenance and bioassays were performed by the LAFICAVE and LEnA laboratories.

### Mosquito rearing

Paddles containing eggs were submerged in dechlorinated water and hatched larvae were transferred to basins (33 × 24 × 8 cm) containing 1 l of dechlorinated water and 100 mg of fish food (TetraMin<sup>®</sup>, Tetra Marine Granules; Tetra GmbH, Melle, Germany) added every 3 days. The resulting adult *Ae. aegypti* mosquitoes were identified to the species level and sorted sex, with 500 females and 500 males maintained in cylindrical carton cages (16 cm in diameter × 18 cm high), where a 10% sucrose solution was offered *ad libitum*. When the number of females were insufficient for producing an F1 generation (less than 100 females), new field collections were requested.

In order to produce eggs for the next generation, females were additionally fed blood from guinea pigs (*Cavia Porcellus* - Linnaeus, 1758) 3 days post-emergence. Alternatively, females were offered to feed on citrated rabbit blood through a Hemotek reservoir membrane feeder (Discovery Workshops, Accrington, UK), containing 6 ml of blood covered with a parafilm membrane, sealed with a rubber ring, at 37 °C for 1 h. F1 generation mosquitoes were employed in the bioassays, although an F2 generation was required whenever the number of F1 generation individuals to perform all larvae and adult assays was insufficient.

Insectaries were maintained under controlled temperature (26 ± 2 °C) and humidity (70 ± 10%) following the Fiocruz biosafety manual for vector insectaries and infectories [20]. About 50 specimens of the parental generation were cryopreserved for the creation of a DNA bank for future genetic analyses. Only male mosquitoes were cryopreserved, eliminating the need to extract the female's abdomen to prevent possible DNA amplification from spermatozoa present in their spermatheca. The Rockefeller [21] reference strain concerning insecticide susceptibility and vigor under laboratory conditions was employed for the determination of diagnostic-doses (DD), and was exposed in parallel in each assay, as an assay quality control. Standardizations of the biological tests performed on both adults and larvae were carried out using this susceptible strain.

### DD estimations

Before the susceptibility evaluations of field *Ae. aegypti* populations, the DD for pyriproxyfen and malathion were estimated, respectively, in larvae and adults, under our local conditions. It is important to note that a WHO reference for a pyriproxyfen DD is still not available so far. The locally established DDs were obtained by dose-response (DR) assays using the Rockefeller strain. The Rockefeller colony maintained at the LEnA was used for the tests in both laboratories.

### DD estimation for pyriproxyfen

Larval bioassays were conducted with an IGR pyriproxyfen analytical standard (Sigma-Aldrich, Co., St Louis, USA), pre-dissolved in acetone (Sigma-Aldrich) and further diluted in ethanol (Merck, CGaA, Darmstadt, Germany). Following procedures described in the WHO guidelines for larvicide bioassays, with some modifications [22], third-stage larvae (L3 stage) were submitted to a gradient of 13 product concentrations (0.0667 to 0.2337 µg/l), where adult emergence inhibition (EI) percentages were evaluated at the end of 7 to 10 days, when all control larvae had emerged into adults. Four replicates comprising 10 L3 larvae each were prepared for each concentration, and an equal number of controls were prepared using only ethanol. The larvae were fed 10 mg of fish food (TetraMin<sup>®</sup>, Tetra Marine Granules) on the first day and 5 mg on the third day after initial exposure. The assays were followed daily until complete adult emergence in the control group.

Assays were discarded if the EI of the control group was > 10%. If not, they were corrected using the Abbott's formula when EI ranged between 5% and 10% [22]. Four tests were performed at different times. When pupae began to develop, cups were covered with a mesh to avoid eventual adult escapes. Mortality and adult emergence were recorded when all the specimens under the control condition had emerged. Live adults were considered as those totally free of their exuviae and able to fly when gently touched, and the other individuals were considered dead. The EI were calculated using Probit (Polo-PC, LeOra Software, Berkeley, CA, USA) and logistic regression analyses [23]. Finally, the pyriproxyfen DD was determined as twice the dose that inhibited the emergence of adults in 99% (EI<sub>99</sub>) of Rockefeller larvae exposed to the compound.

### DD estimation for malathion

To perform the bioassays, aliquots of OP stock solutions at a concentration of 3000 mg/l were prepared from a malathion analytical standard (Sigma-Aldrich) dissolved in acetone (Sigma-Aldrich) and stored at -80 °C. Glass bottles (250 ml) (Wheaton) were coated on the inside with 1 ml of malathion dissolved in acetone at four concentrations (12, 15, 18 and 20 µg/bottle) prepared from the stock solution 24 h before the test. Two bottles per concentration and one control (coated on the inside with 1 ml of acetone only) were employed for each test, with each bottle containing 25 females aged 3–5 days-old. Six tests with each dose were performed, on distinct days. Mosquitoes were exposed to the insecticide for up to 30 min, and mortality rates were recorded every 10 min. The dose that caused 100% mortality in 30 min was considered as the

**Table 1** Brazilian towns participating in the 2017–2018 *Aedes aegypti* pyriproxyfen and malathion monitoring susceptibility round

No.	Lat <sup>a</sup>	Long <sup>b</sup>	State	Town	N <sup>o</sup>	Lat <sup>a</sup>	Long <sup>b</sup>	State	Town
1	−7.36	−72.67	AC	Cruzeiro do Sul	74	−13.54	−48.22	GO	Minapuçu
2	−9.98	−67.81	AC	<u>Rio Branco</u>	75	−14.09	−46.36	GO	Posse
3	−11.02	−68.75	AC	Brasília	76	−16.77	−47.61	GO	Cristalina
4	−2.63	−56.74	AM	Parintins	77	−16.67	−49.26	GO	<u>Goiânia</u>
5	−0.14	−67.08	AM	São Gabriel da Cachoeira	78	−16.44	−51.12	GO	Iporá
6	−7.51	−63.03	AM	Humaitá	79	−17.89	−51.72	GO	Jataí
7	−4.23	−69.95	AM	Tabatinga	80	−17.74	−49.11	GO	Morrinhos
8	−4.08	−63.14	AM	Coari	81	−19.01	−57.65	MS	Corumbá
9	−3.13	−60.02	AM	<u>Manaus</u>	82	−22.23	−54.81	MS	Dourados
10	0.04	−51.06	AP	<u>Macapá</u>	83	−20.79	−51.71	MS	Três Lagoas
11	3.85	−51.83	AP	Oiapoque	84	−18.51	−54.76	MS	Coxim
12	2.50	−50.94	AP	Calçoene	85	−22.49	−55.71	MS	Ponta Porã
13	−2.44	−54.72	PA	Santarém	86	−20.46	−54.62	MS	<u>Campo Grande</u>
14	−7.10	−49.94	PA	Xinguara	87	−15.57	−56.07	MT	<u>Cuiabá</u>
15	−1.46	−48.49	PA	<u>Belém</u>	88	−16.47	−54.63	MT	Rondonópolis
16	−1.69	−50.48	PA	Breves	89	−10.64	−51.57	MT	Confresa
17	−5.35	−49.14	PA	Marabá	90	−9.87	−56.09	MT	Alta Floresta
18	−3.21	−52.21	PA	Altamira	91	−14.05	−52.16	MT	Água Boa
19	−4.26	−55.99	PA	Itaituba	92	−15.23	−59.34	MT	Pontes e Lacerda
20	−3.77	−49.67	PA	Tucuruí	93	−11.42	−58.76	MT	Juína
21	−8.03	−50.03	PA	Redenção	94	−15.89	−52.26	MT	Barra do Garças
22	−11.43	−61.44	RO	Cacoal	95	−11.86	−55.50	MT	Sinop
23	−10.44	−62.48	RO	Jaru	96	−20.85	−41.11	ES	Cachoeiro do Itapemirim
24	−8.77	−63.83	RO	<u>Porto Velho</u>	97	−20.32	−40.32	ES	<u>Vitória</u>
25	−10.77	−65.32	RO	Guajará-Mirim	98	−18.71	−40.40	ES	Nova Venécia
26	−12.74	−60.14	RO	Vilhena	99	−19.82	−40.28	ES	Aracruz
27	0.94	−60.43	RR	Rorainópolis	100	−23.01	−44.32	RJ	Angra dos Reis
28	2.82	−60.67	RR	<u>Boa Vista</u>	101	−21.75	−41.33	RJ	Campos dos Goytacazes
29	−11.63	−46.82	TO	Dianópolis	102	−22.51	−44.09	RJ	Volta Redonda
30	−10.16	−48.35	TO	<u>Palmas</u>	103	−22.88	−43.23	RJ	<u>Rio de Janeiro</u>
31	−11.73	−49.07	TO	Gurupi	104	−19.94	−43.93	MG	<u>Belo Horizonte</u>
32	−7.19	−48.21	TO	Araguaína	105	−18.85	−41.95	MG	Governador Valadares
33	−9.66	−35.70	AL	<u>Maceió</u>	106	−21.76	−43.35	MG	Juiz de Fora
34	−9.76	−36.66	AL	Arapiraca	107	−16.72	−43.87	MG	Montes Claros
35	−9.38	−38.00	AL	Delmiro Gouveia	108	−19.71	−47.98	MG	Uberaba
36	−11.30	−41.86	BA	Irecê	109	−17.86	−41.51	MG	Teófilo Otoni
37	−13.01	−38.49	BA	<u>Salvador</u>	110	−19.53	−42.62	MG	Coronel Fabriciano
38	−17.54	−39.74	BA	Teixeira de Freitas	111	−21.56	−45.43	MG	Varginha
39	−14.79	−39.27	BA	Itabuna	112	−18.59	−46.52	MG	Patos de Minas
40	−14.21	−41.67	BA	Brumado	113	−21.18	−47.81	SP	Ribeirão Preto
41	−11.66	−39.01	BA	Serrinha	114	−22.12	−51.39	SP	Presidente Prudente
42	−3.72	−38.59	CE	<u>Fortaleza</u>	115	−23.50	−47.46	SP	Sorocaba
43	−3.69	−40.35	CE	Sobral	116	−20.81	−49.38	SP	São José do Rio Preto
44	−5.18	−40.67	CE	Crateús	117	−23.81	−45.40	SP	São Sebastião
45	−4.96	−39.01	CE	Quixadá	118	−23.57	−46.57	SP	<u>São Paulo</u>
46	−6.40	−38.86	CE	Icó	119	−25.54	−54.59	PR	Foz do Iguaçu
47	−7.21	−39.32	CE	Juazeiro do Norte	120	−23.31	−51.16	PR	Londrina
48	−6.76	−38.23	PB	Sousa	121	−23.08	−52.46	PR	Paranavaí
49	−7.15	−34.87	PB	<u>João Pessoa</u>	122	−23.42	−51.94	PR	Maringá

**Table 1 (continued)**

No.	Lat <sup>a</sup>	Long <sup>b</sup>	State	Town	N <sup>o</sup>	Lat <sup>a</sup>	Long <sup>b</sup>	State	Town
50	−7.22	−35.88	PB	Campina Grande	123	−26.08	−53.06	PR	Francisco Beltrão
51	−7.04	−35.63	PB	Alagoa Grande	124	−27.87	−54.48	RS	Santa Rosa
52	−8.06	−34.89	PE	<u>Recife</u>	125	−29.95	−50.99	RS	Gravatá
53	−8.07	−39.12	PE	Salgueiro	126	−28.26	−52.41	RS	Passo Fundo
54	−8.89	−36.49	PE	Garanhuns	127	−29.69	−53.81	RS	Santa Maria
55	−9.40	−40.50	PE	Petrolina	128	−30.38	−56.45	RS	Quaraí
56	−8.68	−35.59	PE	Palmares	129	−26.73	−53.52	SC	São Miguel do Oeste
57	−7.58	−40.50	PE	Araripina	130	−26.87	−52.40	SC	Xanxerê
58	−7.96	−36.20	PE	Santa Cruz do Capibaribe	131	−26.91	−48.66	SC	Itajaí
59	−6.77	−43.02	PI	Floriano	132	−27.11	−52.62	SC	Chapecó
60	−5.09	−42.81	PI	<u>Teresina</u>	133	−10.94	−69.56	AC	Assis Brasil
61	−2.90	−41.78	PI	Parnaíba	134	−9.07	−68.66	AC	Sena Madureira
62	−7.08	−41.47	PI	Picos	135	0.78	−51.95	AP	Pedra Branca do Amapari
63	−9.02	−42.69	PI	São Raimundo Nonato	136	−0.86	−52.54	AP	Laranjal do Jari
64	−5.75	−35.25	RN	<u>Natal</u>	137	−9.37	−37.25	AL	Santana do Ipanema
65	−6.11	−38.20	RN	Pau dos Ferros	138	−12.14	−45.00	BA	Barreiras
66	−6.59	−36.77	RN	Jardim do Seridó	139	−4.57	−37.77	CE	Aracati
67	−5.19	−37.36	RN	Mossoró	140	−4.23	−44.78	MA	Bacabal
68	−2.53	−44.30	MA	<u>São Luís</u>	141	−7.53	−46.04	MA	Balsas
69	−10.91	−37.05	SE	<u>Aracaju</u>	142	−5.51	−45.24	MA	Barra do Corda
70	−10.22	−37.42	SE	Nossa Senhora da Glória	143	−5.53	−47.48	MA	Imperatriz
71	−10.69	−37.43	SE	Itabaiana	144	−22.29	−42.53	RJ	Nova Friburgo
72	−10.92	−37.67	SE	Lagarto	145	−17.22	−46.88	MG	Paracatu
73	−15.79	−47.89	DF	<u>Brasília</u>	146	−27.59	−48.55	SC	<u>Florianópolis</u>

<sup>a</sup> Latitude<sup>b</sup> Longitude

Note: State capitals underlined. State acronyms: AC, Acre; AM, Amazonas; AP, Amapá; PA, Pará; RO, Rondônia; RR, Roraima; TO, Tocantins; AL, Alagoas; BA, Bahia; CE, Ceará; PB, Paraíba; PE, Pernambuco; PI, Piauí; RN, Rio Grande do Norte; MA, Maranhão; SE, Sergipe; DF, Distrito Federal; GO, Goiás; MS, Mato Grosso do Sul; ES, Espírito Santo; RJ, Rio de Janeiro; MG, Minas Gerais; SP, São Paulo; PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina

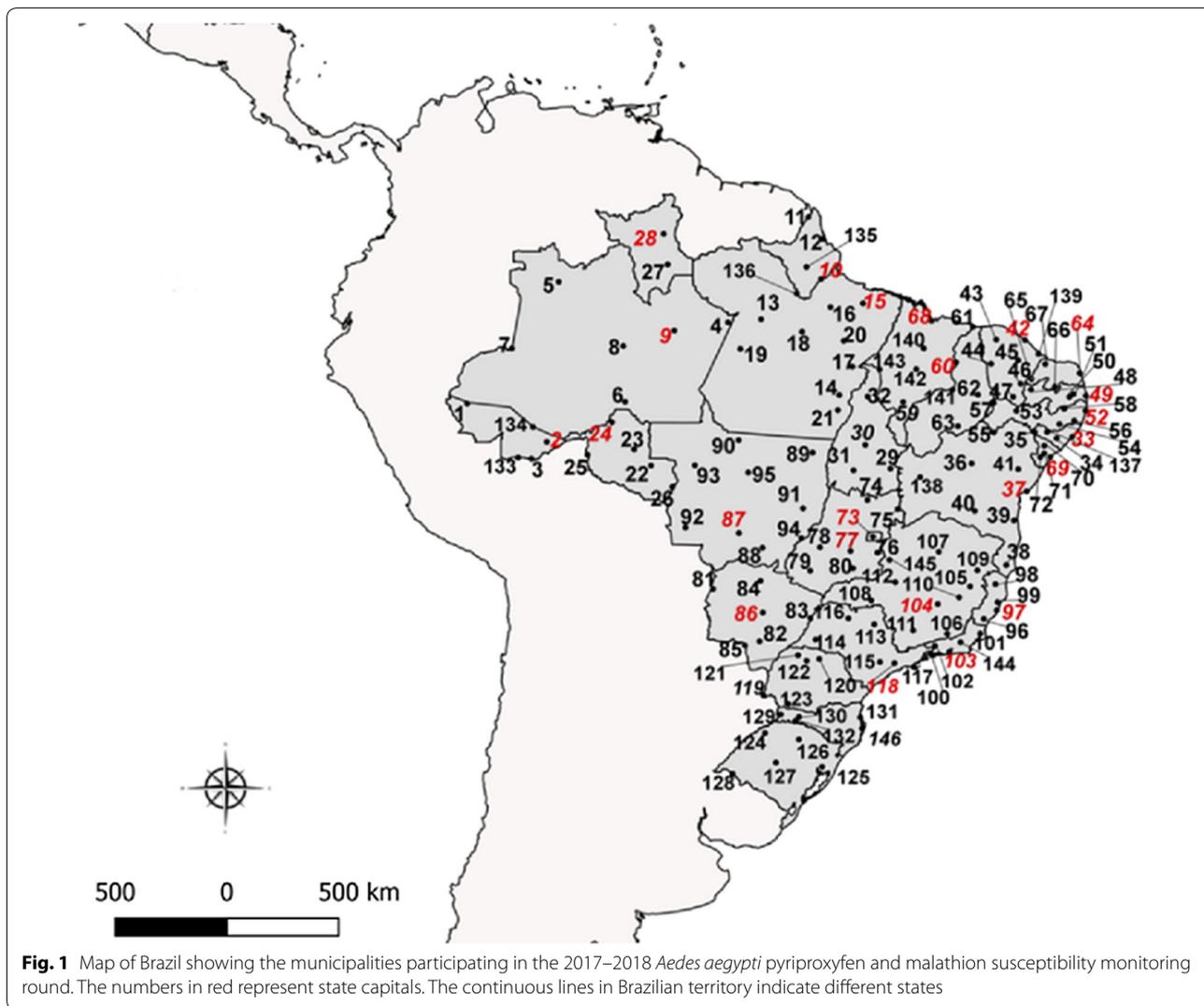
DD, as recommended by the WHO [22]. The DD tests with field populations consisted of 25 females aged 3 to 5 days old gently blown with a Castor aspirator inside the bottles: 4 bottles coated with the malathion DD and 2 controls coated with acetone only. Addition tests were conducted applying the WHO recommended DD (50 µg/bottle) [24]. Three independent assays were performed for each population and using both laboratory-determined and WHO recommended DDs.

### Evaluation of pyriproxyfen susceptibility in field populations

#### First screening with DD

Once DD of the pyriproxyfen was obtained, larvae from each field population (16 replicates of 10 larvae, totaling 160 larvae) were exposed to the IGR DD, while 80 larvae from the same population (8 replicates of 10 larvae) were used as the negative control (ethanol only). In parallel, 80 Rockefeller larvae (8 replicates of 10 larvae) were also exposed to the DD, as the internal control of

assay conditions. Only healthy larvae exhibiting normal movement and from the same breeding site were selected for each test. The IGR solutions were prepared from a pyriproxyfen analytical standard (Sigma-Aldrich) pre-dissolved in acetone (Sigma-Aldrich) and further diluted in ethanol (Merck®). Aliquots containing 15 µl of the IGR at a concentration of 100,000 mg/l were prepared and stored at −80 °C. These aliquots were then used to prepare 5 ml stock solutions at a concentration of 300 mg/l and were stored in a refrigerator for up to 30 days. A new dilution was prepared on the same day of the tests from these stock solutions, at a final concentration from which 1 ml would result in the desired DD in the 250 ml test cups. Each population was tested four independent times. The EI of each population was established as the means of these four assays. A total of 240 larvae from the evaluated field population (including their replicates) were necessary for each dose-diagnostic test, totaling 960 larvae in the four repetitions performed in different rounds. WHO criteria were applied to classify the



populations as susceptible, exhibiting suggested resistance or resistant, when EI were  $\geq 98\%$ , between 90 and 97.9% and  $< 90\%$ , respectively [22].

**Resistance ratio estimation**

Field populations not susceptible to pyriproxyfen (EI  $< 98\%$ ) in DD assays were submitted to a DR assay in order to quantify their resistance levels. Larvae were exposed to a range of 10 concentrations (0.008–0.45  $\mu\text{g/l}$ ) in four replicates comprising 10 L3 larvae each and four control replicates using ethanol only. The Rockefeller strain was run in parallel, consisting of four replicates, with larvae exposed to the DD only. Mortality and metamorphosis rates were recorded until the emergence of all adults in the control condition. A total of 440 larvae were evaluated in each DR test, including their replicates, requiring 1760 larvae from each field population to perform the repetitions of the four different rounds.

The inhibition of 50% and 95% adult emergence (EI<sub>50</sub> and EI<sub>95</sub>) of each population were obtained by a probit analysis [25]. Resistance ratios were obtained by dividing the EI (50 and 95) of each population by the equivalent EI of the Rockefeller reference strain. Populations were classified as suggested by Mazzarri & Georghiou [26] into low, moderate, or high resistance respectively for RR<sub>95</sub>  $< 5$ , between 5.0–10.0, and  $> 10.0$ .

**Evaluation of malathion susceptibility in field populations**

The *Ae. aegypti* populations were tested using adult females, 3 to 5 days post-emergence and not blood-fed, from the F1 or F2 generations. Each test consisted of the exposure of 20 to 25 females per bottle, with 4 bottles coated on the inside with each DD (the DD evaluated herein and 50  $\mu\text{g/bottle}$ ) in addition to 2 bottles coated on the inside with acetone only as the negative control. The reference Rockefeller strain was run in parallel with

2 bottles coated with each DD. Mortality rates were recorded every 15 min, and mosquitoes that could not stand, were considered dead. Mortality rates for the replicates of each DD were calculated at the diagnosis time (30 min) in each assay. A total of 4 bioassays were performed for each population, and the final result considered the mean mortality of these bioassays. A total of 1000 females from each field population were used to carry out four different rounds of these tests, comprising 250 females in each, including replicates.

The DD and DR assays for both the IGR and adulticide compounds were performed under test-insectary conditions, with controlled temperature ( $26 \pm 2$  °C) and humidity ( $70 \pm 10\%$ ).

#### Data analysis

The percentages of adult emergence inhibition, lethal doses (LD), their respective confidence intervals (95% CI) and the population slope were calculated by the Polo-PC software, employing a probit analysis [25]. Resistance ratios (RR) were obtained by the quotient between the LD of a population by the Rockefeller reference strain values. Maps were constructed using the QGIZ version 2.18.6 and GIMP version 2.10.14 software packages [23].

#### Results

A total of 146 urban Brazilian cities were selected to evaluate *Ae. aegypti* susceptibility/resistance to insecticides current employed in official national campaigns throughout the country (Table 1, Fig. 1), based on a geographical representation proposal. State capitals, international borders and cities exhibiting previous insecticide resistance data were preferentially selected. Appropriate egg sampling was performed in 140 (95.9%) localities. Eggs from 14 (9.6%), however, did not hatch or the number of resulting larvae were insufficient to produce a F1 generation (less than 100 females). Thus, new samplings were carried out in a further six (4.1%) localities. Female numbers remained low even after a second collection and F1 *Ae. aegypti* colonies were raised with less than 100 F0 females for four localities, namely Parintins (Amazonas), Irecê (Bahia), Quixadá (Ceará) and Salgueiro (Pernambuco). A total of 132 *Ae. aegypti* populations (94.3% of the initially planned point collections) were evaluated. The number of *Ae. aegypti* mosquitoes obtained per population ranged from 48 to 2438 females and from 54 to 2563 males. *Aedes albopictus* was present in 59.8% (78/132) of the populations, at 1–419 females and 1–455 male ratios.

Table 2 presents information regarding the geographical origin, number of total and positive paddles (paddles containing eggs), mean egg numbers in positive paddles, total resulting adults for both *Ae. aegypti* and *Ae.*

*albopictus*, adult emergence inhibition (EI) to the IGR larvicide and mortality after exposure to the adulticide organophosphate.

The dose-diagnostic (DD) obtained for pyriproxyfen was of 0.015 µg/l (Table 3). Among the 132 evaluated populations, six (4.5%) from the Brazilian northeastern cities of Itabuna, Brumado and Serrinha (Bahia), Quixadá, Icó, and Juazeiro do Norte (Ceará), presented EI < 98%, thus being subjected to DR tests to assess resistance levels (Table 2, Fig. 2). Resistance ratios (RR<sub>50</sub> and RR<sub>95</sub>) were low in these populations, ranging between 1.07–1.97 (RR<sub>50</sub>) or 1.51–3.58 (RR<sub>95</sub>) (Table 4), indicating low resistance. Approximately 137,280 larvae were tested to perform all dose-diagnostic larval assays for the 132 populations, followed by DR assays in six populations that did not exhibit pyriproxyfen susceptibility.

The DD obtained for malathion under our laboratory conditions was of 20 µg/bottle (Fig. 3), 2.5-fold lower than the established WHO value (50 µg/bottle). In the 20 µg/bottle DD tests (Fig. 4a), 28 populations (21.4%) presented mortality above 98% (susceptible), 30 (22.9%) exhibited mortality between 90 and 98% (suggested resistance) and 73 populations (55.7%) displayed mortality below 90% (confirmed resistance). On the other hand, when exposed to 50 µg/bottle (Fig. 4b), most of the populations (121, 92.4%) were considered susceptible, and the remaining (10, 7.6%), as presenting “suggested resistance”, with mortality rates ranging from 90 and 98%. Approximately 131,000 *Ae. aegypti* female adults from 131 field populations were required for the malathion susceptibility testing. As noted in the map displayed in Fig. 4a, although localities with populations where resistance to 20 µg/bottle malathion was suggested are spread out throughout the country, the north region concentrates the highest percentage of resistant populations (71.9%).

#### Discussion

The present study evidenced the feasibility of conducting an insecticide resistance monitoring action in a standardized and strongly coordinated manner, applying a model that may be of assistance in implementing national monitoring plans in other countries. A systematic literature review covering insecticide resistance data in *Ae. aegypti* field populations from Latin America and the Caribbean indicates that less than half of the countries in this region have published bioassay data between 2008 and 2018 [7]. In addition, the number of populations representing each national surveillance was generally rather low [7]. Susceptibility monitoring to temephos and deltamethrin carried out between 1999 and 2011 by the previous “National Network for Monitoring the Resistance of *Ae. aegypti* to Insecticides” generally evaluated between 25 and 74 populations every two years [17].

Out of all *Ae. aegypti* populations evaluated herein, 99.3% were classified as susceptible to the IGR pyriproxyfen. The six resistant populations were from the same geographical region (Northeast), in the states of Bahia (Itabuna, Brumado and Serrinha) and Ceará (Quixadá, Icó and Juazeiro do Norte), suggesting the emergence of localized pyriproxyfen resistance. Interestingly, some of these populations exhibited discrepant  $RR_{50}$  and  $RR_{95}$  values, suggesting a heterogeneous response within the population, as represented by low slope values (Table 4). These populations are likely experiencing an initial selection process, where only some individuals exhibit resistance so far. We hypothesized that this regionalization is related to differences in operational applications and the amount of applied insecticides, as well as due to population genetic background peculiarities, although no evidence to support this so far is available. It is noteworthy that *Ae. aegypti* populations from the Northeast presented the highest levels of temephos resistance in Brazil [9], as well lower residual effects in field assays, noted in populations from localities where high temephos RRs were previously described [27]. These data were collected before the introduction of pyriproxyfen use, suggesting cross-resistance. In the case of Itabuna, in the state of Bahia, simulated field trials carried out in 2015 demonstrated 100% pyriproxyfen efficacy within 30 days after application, albeit with a significant drop in the EI after 45 days [28]. Further investigations are required in order to better understand the mechanisms related to this trend.

We evidenced that the lowest malathion concentration able to kill 100% of Rockefeller females in 30 min was 20  $\mu\text{g}/\text{bottle}$ , a 2.5-fold lower dose than that recommended by WHO in bottle assays (50  $\mu\text{g}$ ) [24]. No malathion-resistant populations (mortalities of less than 90%) were observed when the WHO DD 50  $\mu\text{g}/\text{bottle}$  was employed, while 73 populations (55.8% of the total evaluated) were classified as resistant in the 20  $\mu\text{g}/\text{bottle}$  exposure assays. The WHO-suggested DD is based on tests performed in reference laboratories and estimated from a variety of susceptible strains for resistance detection, seeking easy testing and reliability. This DD should be considered as a guide that may be refined for local situations whenever possible [29]. The local DD was more sensitive in the early discrimination of resistant individuals. This results in an interesting approach in identifying decreased susceptibility before reaching levels that may incur in loss of insecticide effectiveness in the field. The resistance monitoring programme in Brazil seeks to detect early susceptibility changes so that the applied product may be changed in a timely manner. Early detection would also permit management approaches enabling to more rapidly

revert to the susceptible status of a population in cases where resistance is not so high.

The meaning of laboratory-observed resistance associated to product effectiveness under field conditions should be studied. Assessments conducted two decades ago had already reported *Ae. aegypti* resistance to malathion in northeastern Brazilian populations, when OPs were used to control both the larval (temephos) and adult (malathion) phases [17]. Insecticide selection against *Ae. aegypti* in Brazil followed the WHO criteria, also indicating that a product should be replaced in areas with a high RR ( $> 10.0$ ) and with confirmed lack of efficacy in simulated field tests [11]. However, insecticide substitution takes an average of two years [2], since it depends on series of bureaucratic processes. Therefore, the time spent between the first detection of resistance in a laboratory bioassay and the effective change of the compound in the field has not been effective in precluding the spread of insecticide resistance. In order to avoid decreased insecticide effectiveness in the field, a more sensitive replacement criterion has been adopted since 2006. In this regard, changing the active ingredient of the insecticide is recommended in localities where mosquito populations present mortality rates below 70% in DD assays or with  $RR_{95} > 3.0$ , which occurs before the previous applied management criteria, of mortality rates below 80% in DD assays and  $RR_{95} > 10.0$  [11]. Results for the state of São Paulo were the basis for this arrangement, where simulated field trials with temephos demonstrated failures in the control of *Ae. aegypti* in populations exhibiting  $RR_{95} > 3.0$ . PYs were ineffective in simulated field trials against populations with mortality rates below 70% in the DD in laboratory bioassays [30]. This was a very severe criterion, aiming to preserve resistance evolution or reverse it. Since no RR values  $> 5$  for pyriproxyfen are observed in the country, IGR use may be continued, although the best scenario would be to apply another insecticide class in locations presenting suggested resistance.

Concerning adulticides, the situation is alarming, since there is only one available alternative to PY and to the OP malathion, i.e. the association of prallethrin with imidacloprid [31]. In the most recent national evaluation concerning PYs (2011 and 2012) high RRs for deltamethrin were observed throughout the country [8]. In addition, localities with higher numbers of dengue incidence in São Paulo were also those exhibiting higher levels of PY resistance, although these compounds were no longer being applied by governmental campaigns against *Ae. aegypti*. This is associated to the excessive use of insecticides in households, especially during arbovirus epidemic seasons, and PYs application against other urban vectors, as observed in an area where an intense campaign against

**Table 2** Evaluation of resistance to pyriproxyfen and malathion in *Aedes aegypti* from Brazil, 2017–2018

Nº	Reg	State	Town	Paddles		Adult mosquitoes <sup>a</sup>				Insecticide		Malathion ( <i>Ae. aegypti</i> adults)				
				total	pos <sup>b</sup>	mean eggs in pp <sup>c</sup>		<i>Ae. aegypti</i>		<i>Ae. albopictus</i>		Pyriproxyfen ( <i>Ae. aegypti</i> larvae)	Mort% cont <sup>h</sup>	Mort% (DD 20) <sup>i</sup>	Mort% (DD 50) <sup>j</sup>	
						fem <sup>d</sup>	male	fem <sup>d</sup>	male	EI% cont <sup>e</sup>	EI% (DD 0.03) <sup>f</sup>					EI% cor <sup>g</sup>
1	N	AC	Cruzeiro do Sul	196	72	73.3	601	793	0	0	0.94	100.0	NN	0.00	58.2	99.3
2	N	AC	Rio Branco	294	188	83.8	2377	2533	0	0	1.61	100.0	NN	0.00	75.3	99.0
3	N	AC	Brasileia	100	43	67.7	734	814	0	0	0.31	99.5	NN	0.00	71.4	99.4
4	N	AM	Parintins	196	39	69.5	90	54	96	91	0.94	100.0	NN	0.00	75.3	100.0
5	N	AM	São Gabriel da Cachoeira	200	46	101.7	423	383	0	0	3.25	100.0	NN	0.00	100.0	100.0
6	N	AM	Humaitá	200	67	28.9	696	690	0	0	1.88	100.0	NN	0.00	57.0	99.7
7	N	AM	Tabatinga	172	50	64.3	472	504	0	0	0.00	100.0	NN	0.00	68.7	98.7
8	N	AM	Coari	196	70	WI	253	216	0	0	0.63	100.0	NN	0.00	63.3	98.3
9	N	AM	Manaus	512	207	48.8	1021	1047	187	98	1.50	100.0	NN	0.00	41.0	98.0
10	N	AP	Macapá	265	79	32.5	296	209	0	0	0.31	100.0	NN	0.00	80.6	100.0
11	N	AP	Oiapoque	200	28	33.1	WI	WI	WI	WI	2.81	100.0	NN	0.00	93.3	100.0
12	N	AP	Calçoene	74	14	45.3	207	178	0	0	1.56	100.0	NN	0.00	76.4	98.8
13	N	PA	Santarém	302	87	43.7	362	382	102	78	5.00	100.0	NN	0.00	85.3	98.8
14	N	PA	Xinguara	202	35	107.0	515	501	0	0	0.94	99.5	NN	0.00	75.5	99.1
15	N	PA	Belém	600	361	55.0	1751	1787	419	342	1.33	99.5	NN	0.00	75.0	98.6
16	N	PA	Breves	202	26	101.7	516	512	4	7	1.87	99.5	NN	0.00	83.2	97.2
17	N	PA	Marabá	300	96	77.0	503	500	0	1	2.75	99.4	NN	0.00	79.5	100.0
18	N	PA	Altamira	304	103	66.9	526	503	4	28	3.44	99.1	NN	0.00	88.1	99.4
19	N	PA	Itaituba	200	102	96.2	426	392	416	280	2.19	98.9	NN	0.00	35.5	99.4
20	N	PA	Tucuruí	198	93	79.4	504	501	219	158	3.43	98.9	NN	0.00	80.1	96.6
21	N	PA	Redenção	200	29	88.7	384	321	1	1	0.63	98.3	NN	0.00	65.8	98.5
22	N	RO	Cacoal	196	52	29.3	329	414	0	8	0.00	100.0	NN	0.00	100.0	100.0
23	N	RO	Jaru	200	85	91.9	1843	1607	141	72	0.50	100.0	NN	0.00	99.0	100.0
24	N	RO	Porto Velho	300	116	54.0	1222	1042	257	167	0.75	99.9	NN	0.00	100.0	100.0
25	N	RO	Guajará-Mirim	194	58	44.4	1248	1374	0	0	0.31	99.8	NN	0.00	99.3	100.0
26	N	RO	Vilhena	200	79	57.1	1457	1583	0	0	0.00	99.2	NN	0.00	100.0	100.0
27	N	RR	Rorainópolis	WI	39	54.5	352	198	0	0	0.62	100.0	NN	0.00	87.4	100.0
28	N	RR	Boa Vista	300	166	78.4	2293	2428	1	6	0.25	98.8	NN	0.00	83.0	100.0
29	N	TO	Dianópolis	204	31	29.1	206	249	0	0	0.00	100.0	NN	0.00	99.3	100.0
30	N	TO	Palmas	288	92	77.7	578	262	12	32	2.25	100.0	NN	0.00	61.7	99.7
31	N	TO	Gurupi	208	35	30.1	240	251	0	0	0.63	99.9	NN	0.00	99.3	100.0
32	N	TO	Araguaína	344	129	45.7	501	500	1	1	2.49	98.4	NN	0.00	63.0	99.1

Table 2 (continued)

NO	Reg	State	Town	Paddles		Adult mosquitoes <sup>a</sup>				Insecticide						
				total	pos <sup>b</sup>	mean eggs in pp <sup>c</sup>		<i>Ae. aegypti</i>		<i>Ae. albopictus</i>		Pyriproxifen ( <i>Ae. aegypti</i> larvae)		Malathion ( <i>Ae. aegypti</i> adults)		
						male	female	male	female	male	female	EI% cont <sup>e</sup>	EI% (DD 0.03) <sup>f</sup>	EI% cor <sup>g</sup>	Mort% cont <sup>h</sup>	Mort% (DD 20) <sup>i</sup>
33	NE	AL	Maceió	386	102	60.9	496	395	41	20	1.56	100.0	NN	0.00	92.3	99.7
34	NE	AL	Arapiraca	296	92	80.2	1128	1007	0	0	0.31	99.1	NN	0.00	94.1	99.4
35	NE	AL	Delmiro Gouveia	184	87	37.8	523	309	0	0	5.00	98.6	NN	0.00	56.9	99.1
36	NE	BA	Irecê	210	23	17.2	48	59	0	0	0.63	100.0	NN	0.00	99.3	100.0
37	NE	BA	Salvador	878	327	84.7	2264	2349	140	173	0.31	100.0	NN	0.00	100.0	100.0
38	NE	BA	Teixeira de Freitas	220	83	51.8	503	502	0	0	3.44	98.8	NN	0.00	86.0	99.1
39	NE	BA	Itabuna	349	155	63.4	505	606	0	2	0.94	96.5	NN	0.00	89.1	98.1
40	NE	BA	Brumado	220	90	43.4	289	322	1	1	1.56	91.6	NN	0.00	86.8	99.1
41	NE	BA	Serrinha	204	99	47.0	500	500	0	0	0.63	85.8	NN	0.00	83.1	98.1
42	NE	CE	Fortaleza	696	269	67.1	1491	1829	80	92	1.94	100.0	NN	0.00	70.6	98.3
43	NE	CE	Sobral	300	97	70.8	872	927	0	0	1.88	99.8	NN	0.00	44.2	98.5
44	NE	CE	Cratús	100	WI	WI	871	1011	0	0	2.25	99.3	NN	0.00	31.3	97.3
45	NE	CE	Quixadá	192	34	74.3	76	64	0	0	3.75	97.7	NN	0.00	81.0	100.0
46	NE	CE	Icó	200	131	70.9	1919	1997	27	10	3.43	96.1	NN	0.00	87.3	100.0
47	NE	CE	Juazeiro do Norte	300	138	178.2	502	500	0	1	1.56	95.3	NN	0.00	58.8	99.1
48	NE	PB	Sousa	200	63	29.9	405	426	0	0	3.44	100.0	NN	0.00	75.0	99.3
49	NE	PB	João Pessoa	388	239	50.3	1756	1816	34	31	0.63	100.0	NN	0.00	64.3	91.3
50	NE	PB	Campina Grande	300	91	43.4	1007	1013	0	0	1.25	98.6	NN	0.00	87.2	99.7
51	NE	PB	Alagoa Grande	200	88	31.1	510	508	0	0	0.63	98.1	NN	0.00	88.9	99.4
52	NE	PE	Recife	891	455	66.1	731	730	87	68	0.00	100.0	NN	0.00	97.3	100.0
53	NE	PE	Salgueiro	224	18	22.9	86	127	0	0	0.31	100.0	NN	0.00	100.0	100.0
54	NE	PE	Garanhuns	219	47	22.6	274	297	0	0	0.94	100.0	NN	0.00	94.5	99.1
55	NE	PE	Petrolina	300	29	18.8	126	138	0	0	0.62	100.0	IS	IS	IS	IS
56	NE	PE	Palmares	198	90	74.6	962	877	102	71	0.31	99.8	NN	0.00	96.0	100.0
57	NE	PE	Araripina	WI	107	48.9	881	834	0	0	1.88	99.8	NN	0.00	37.6	98.8
58	NE	PE	Santa Cruz do Capibaribe	303	144	70.1	511	566	0	0	2.19	98.9	NN	0.00	93.9	99.1
59	NE	PI	Florianópolis	190	56	20.9	757	736	54	29	2.75	100.0	NN	0.00	100.0	100.0
60	NE	PI	Teresina	414	125	44.0	915	1034	360	273	2.00	99.8	NN	0.00	99.7	100.0
61	NE	PI	Parnaíba	251	190	78.3	1950	2191	77	63	0.25	99.6	NN	0.00	98.3	100.0
62	NE	PI	Picos	100	29	54.7	307	299	0	0	6.87	98.4	NN	0.00	77.0	100.0
63	NE	PI	São Raimundo Nonato	100	23	20.1	165	191	0	0	2.58	98.3	NN	0.00	81.1	92.9

Table 2 (continued)

NO	Reg	State	Town	Paddies		Adult mosquitoes <sup>a</sup>				Insecticide				Malathion ( <i>Ae. aegypti</i> adults)		
				total	pos <sup>b</sup>	mean eggs in pp <sup>c</sup>		<i>Ae. aegypti</i>		<i>Ae. albopictus</i>		Pyriproxifen ( <i>Ae. aegypti</i> larvae)		Mort% (DD 20) <sup>j</sup>		
						ferm <sup>d</sup>	male	ferm <sup>d</sup>	male	EI% cont <sup>e</sup>	EI% (DD 0.03) <sup>f</sup>	EI% cor <sup>g</sup>	Mort% cont <sup>h</sup>	Mort% (DD 20) <sup>i</sup>	Mort% (DD 50) <sup>j</sup>	
64	NE	RN	Natal	400	277	66.0	1761	1847	144	188	0.00	100.0	NN	0.00	100.0	100.0
65	NE	RN	Pau dos Ferros	238	45	59.1	806	854	0	0	0.83	100.0	NN	0.00	99.0	100.0
66	NE	RN	Jardim do Seridó	100	62	74.1	507	507	0	3	3.44	100.0	NN	0.00	87.2	99.4
67	NE	RN	Mossoró	298	205	78.6	2012	1858	0	0	1.00	99.9	NN	0.00	99.3	100.0
68	NE	MA	São Luís	406	154	58.0	1882	2148	152	102	1.56	100.0	NN	0.00	99.6	100.0
69	NE	SE	Aracaju	416	196	78.6	2438	2563	32	41	0.31	100.0	NN	0.00	99.3	100.0
70	NE	SE	Nossa Senhora da Glória	214	84	94.6	500	502	0	7	3.75	99.7	NN	0.00	85.5	98.4
71	NE	SE	Itabatiana	324	139	44.5	504	503	0	2	1.25	98.4	NN	0.00	95.0	99.7
72	NE	SE	Lagarto	328	192	78.2	508	500	0	2	4.00	98.2	NN	0.00	89.0	98.2
73	MW	DF	Brasília	291	35	50.8	454	526	6	8	1.25	100.0	NN	0.00	95.6	100.0
74	MW	GO	Minas	100	33	28.9	174	86	215	178	2.19	100.0	NN	0.00	71.6	100.0
75	MW	GO	Posse	200	81	45.6	564	535	237	203	1.25	100.0	NN	0.00	90.1	98.2
76	MW	GO	Cristalina	WI	98	54.2	1003	930	0	0	0.31	99.8	NN	0.00	82.7	93.4
77	MW	GO	Goiania	604	222	58.3	2211	2129	84	60	3.44	99.4	NN	0.00	69.7	98.6
78	MW	GO	Iporá	200	133	82.3	508	509	0	8	0.50	99.1	NN	0.00	98.4	100.0
79	MW	GO	Jatá	214	121	43.7	513	502	0	0	0.75	98.3	NN	0.00	91.3	100.0
80	MW	GO	Morrinhos	WI	98	88.5	1375	593	1	0	0.94	98.1	NN	0.00	68.9	99.4
81	MW	MS	Corumbá	200	70	45.2	802	1099	0	0	0.00	100.0	NN	0.00	98.3	100.0
82	MW	MS	Dourados	300	126	58.8	1921	2104	6	7	0.00	100.0	NN	0.00	99.3	100.0
83	MW	MS	Três Lagoas	274	80	62.0	919	962	12	13	0.63	100.0	NN	0.00	97.6	100.0
84	MW	MS	Coxim	188	43	29.2	172	165	15	30	3.13	100.0	NN	0.00	98.5	99.7
85	MW	MS	Ponta Porá	189	46	43.0	455	453	0	0	4.69	100.0	NN	0.00	90.7	99.1
86	MW	MS	Campo Grande	408	67	44.6	663	611	0	0	0.31	99.1	NN	0.00	99.0	100.0
87	MW	MT	Cuiabá	394	28	74.1	2399	2369	62	88	0.31	100.0	NN	0.00	82.0	100.0
88	MW	MT	Rondonópolis	900	158	52.0	1207	1300	23	13	0.63	100.0	NN	0.00	82.5	100.0
89	MW	MT	Confresa	108	69	111.2	1581	1715	103	121	2.19	100.0	NN	0.00	62.1	99.7
90	MW	MT	Alta Floresta	118	56	83.4	1394	1411	246	170	2.18	100.0	NN	0.00	80.1	91.6
91	MW	MT	Água Boa	202	WI	WI	518	510	3	7	1.25	99.8	NN	0.00	92.6	100.0
92	MW	MT	Pontes e Lacerda	208	WI	WI	534	544	0	0	1.88	99.8	NN	0.00	84.2	99.1
93	MW	MT	Juína	132	93	72.8	735	1006	0	0	1.25	99.1	NN	0.00	94.1	99.4
94	MW	MT	Barra do Garças	200	101	59.3	503	503	7	34	1.88	98.7	NN	0.00	88.6	100.0

Table 2 (continued)

NO	Reg	State	Town	Paddies		Adult mosquitoes <sup>a</sup>				Insecticide				Malathion ( <i>Ae. aegypti</i> adults)		
				total	pos <sup>b</sup>	mean eggs in pp <sup>c</sup>		<i>Ae. aegypti</i>		<i>Ae. albopictus</i>		Pyriproxifen ( <i>Ae. aegypti</i> larvae)		Mort% (DD 20) <sup>j</sup>		
						ferm <sup>d</sup>	male	ferm <sup>d</sup>	male	EI% cont <sup>e</sup>	EI% (DD 0.03) <sup>f</sup>	EI% cor <sup>g</sup>	Mort% cont <sup>h</sup>	Mort% (DD 20) <sup>i</sup>		
95	MW	MT	Sinop	150	17	30.8	102	85	2	0	0.94	98.7	NN	0.00	88.6	100.0
96	SE	ES	Cachoeiro do Itapemirim	286	163	61.3	1846	1925	248	293	1.88	100.0	NN	0.00	46.8	94.3
97	SE	ES	Vitória	448	233	86.3	278	291	9	4	3.00	99.5	NN	0.00	84.8	99.7
98	SE	ES	Nova Venécia	192	93	73.5	506	503	17	39	3.44	99.4	NN	0.00	88.2	99.1
99	SE	ES	Aracruz	202	WI	WI	500	531	2	13	1.24	98.1	NN	0.00	93.8	98.5
100	SE	RJ	Angra dos Reis	323	107	32.1	425	391	119	118	1.25	100.0	NN	0.00	72.0	100.0
101	SE	RJ	Campos dos Goytacazes	330	119	47.8	1386	1242	14	8	0.00	100.0	NN	0.00	99.3	100.0
102	SE	RJ	Volta Redonda	296	183	88.1	2140	2235	344	455	4.38	100.0	NN	0.00	76.2	100.0
103	SE	RJ	Rio de Janeiro	612	306	61.6	2399	2260	90	82	1.75	100.0	NN	0.00	83.0	99.0
104	SE	MG	Belo Horizonte	1,77	935	68.3	2360	2175	93	96	1.25	100.0	NN	0.00	79.3	100.0
105	SE	MG	Governador Valadares	288	230	60.2	1731	1916	95	114	2.50	100.0	NN	0.00	93.3	100.0
106	SE	MG	Juiz de Fora	404	37	27.2	218	244	46	20	0.00	100.0	NN	0.00	99.0	100.0
107	SE	MG	Montes Claros	396	68	20.9	131	136	0	0	0.94	100.0	NN	0.00	100.0	100.0
108	SE	MG	Uberaba	94	53	35.9	273	289	0	0	0.31	100.0	NN	0.00	98.3	100.0
109	SE	MG	Teófilo Otoni	296	110	29.8	502	502	55	45	4.38	100.0	NN	0.00	82.3	99.4
110	SE	MG	Coronel Fabriciano	264	WI	WI	107	103	0	0	1.25	99.2	NN	0.00	63.5	99.4
111	SE	MG	Varginha	292	39	19.4	210	191	6	3	4.38	98.4	NN	0.00	94.7	99.7
112	SE	MG	Patos de Minas	297	WI	WI	510	504	10	2	0.94	98.1	NN	0.00	90.2	99.7
113	SE	SP	Ribeirão Preto	WI	WI	WI	118	166	0	0	3.13	100.0	NN	0.00	97.5	100.0
114	SE	SP	Presidente Prudente	WI	WI	WI	521	555	0	0	3.13	100.0	NN	0.00	97.8	98.7
115	SE	SP	Sorocaba	WI	WI	WI	500	506	8	15	1.88	100.0	NN	0.00	97.9	98.5
116	SE	SP	São José do Rio Preto	WI	WI	WI	130	184	0	0	0.63	99.8	NN	0.00	95.1	99.1
117	SE	SP	São Sebastião	WI	WI	WI	515	505	32	2	2.81	99.8	NN	0.00	87.9	99.1
118	SE	SP	São Paulo	WI	WI	WI	500	529	0	0	0.63	99.5	NN	0.00	86.1	99.5
119	S	PR	Foz do Iguaçu	298	72	61.6	947	878	11	7	0.00	100.0	NN	0.00	86.7	100.0
120	S	PR	Londrina	400	180	77.4	1537	1955	37	59	1.25	100.0	NN	0.00	78.0	100.0
121	S	PR	Paranaíba	200	50	67.5	502	512	0	0	2.25	100.0	NN	0.00	91.1	98.8
122	S	PR	Maringá	400	149	60.4	504	500	0	3	2.50	100.0	NN	0.00	78.4	96.5
123	S	PR	Francisco Beltrão	194	29	31.3	241	241	0	0	0.00	99.1	NN	0.00	93.7	99.7
124	S	RS	Santa Rosa	200	116	76.3	164	123	3	0	3.85	100.0	NN	0.00	90.6	100.0
125	S	RS	Gravatá	292	175	58.8	584	776	0	42	3.13	99.7	NN	0.00	94.5	98.8

**Table 2 (continued)**

N0	Reg	State	Town	Paddles		Adult mosquitoes <sup>a</sup>				Insecticide		Malathion ( <i>Ae. aegypti</i> adults)				
				total	pos <sup>b</sup>	<i>Ae. aegypti</i>		<i>Ae. albopictus</i>		Pyriproxyfen ( <i>Ae. aegypti</i> larvae)		Mort% cont <sup>h</sup>	Mort% (DD 20) <sup>j</sup>	Mort% (DD 50) <sup>j</sup>		
						fem <sup>d</sup>	male	fem <sup>d</sup>	male	El% cont <sup>e</sup>	El% (DD 0.03) <sup>f</sup>				El% cor <sup>g</sup>	
126	S	RS	Passo Fundo	300	164	36.6	528	668	0	1	1.25	99.7	NN	0.00	<b>97.3</b>	98.5
127	S	RS	Santa Maria	300	180	101.0	524	502	0	2	3.08	98.8	NN	0.00	<b>57.8</b>	98.8
128	S	RS	Quaraí	199	20	34.6	219	210	0	0	4.36	98.5	NN	0.00	<b>94.0</b>	100.0
129	S	SC	São Miguel do Oeste	200	51	46.1	664	637	18	6	0.31	99.8	NN	0.00	<b>78.7</b>	100.0
130	S	SC	Xanxerê	200	89	44.8	1000	1323	0	0	0.00	99.6	NN	0.00	<b>73.3</b>	99.1
131	S	SC	Itajaí	300	219	45.4	2074	2247	30	33	1.56	99.5	NN	0.00	<b>87.7</b>	100.0
132	S	SC	Chapecô	300	143	99.9	1050	1022	0	3	2.50	98.4	NN	0.00	98.1	100.0

Notes: Results are presented in percentage of adult emergence inhibition (EI) or mortality to diagnostic doses of the insecticides. <sup>a</sup>Adult mosquitoes: total of adult mosquitoes (*Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*) from rearing of each field population (F0 generation). <sup>b</sup>pos: positive paddle. <sup>c</sup>mean eggs in pp: mean eggs in positive paddle. <sup>d</sup>fem: female. <sup>e</sup>El% cont: Percentage of adult emergence inhibition in control group. <sup>f</sup>El%: Percentage of adult emergence inhibition, 0.03 µg/l Diagnostic Dose (DD). <sup>g</sup>El% cor: EI corrected by Abbott's formula if necessary (when was between 5% and 10%). <sup>h</sup>Mort% cont: Percentage of mortality in control group. <sup>i</sup>Mort%: Percentage of mortality, 20 µg/DD. <sup>j</sup>Mort%: Percentage of mortality, 50 µg/DD (WHO, 2016). Underlined: State capitals. Bold: non-susceptible population (EI or mortality below 98%) (WHO, 2016). Wt: Without information. IS: Insufficient sample quantity to perform the assay. NN: Correction wasn't necessary. Regions acronyms: N: North, NE: Northeast, CW: Mid-West, SE: South-East, S: South, States acronyms: AC: Acre, AM: Amazonas, AP: Amapá, PA: Pará, RO: Rondônia, RR: Roraima, TO: Tocantins, AL: Alagoas, BA: Bahia, CE: Ceará, PB: Paraíba, PE: Pernambuco, PI: Piauí, RN: Rio Grande do Norte, MA: Maranhão, SE: Sergipe, DF: Distrito Federal, GO: Goiás, MS: Mato Grosso do Sul, ES: Espírito Santo, RJ: Rio de Janeiro, MG: Minas Gerais, SP: São Paulo, PR: Paraná, RS: Rio Grande do Sul, SC: Santa Catarina.

**Table 3** Dose-response bioassay to determine the pyriproxyfen diagnostic dose for *Aedes aegypti*, Rockefeller strain

El <sub>50</sub> (µg/l) <sup>a</sup>	Cl <sub>50</sub> (µg/l) <sup>b</sup>	El <sub>99</sub> (µg/l) <sup>a</sup>	Cl <sub>99</sub> (µg/l) <sup>b</sup>	Slope
0.06205	0.06012–0.06394	0.15589	0.14655–0.16733	5.8164

<sup>a</sup> El<sub>50</sub> and El<sub>99</sub>: pyriproxyfen concentrations needed to inhibition of 50% and 99% adults emergence, respectively

<sup>b</sup> CI: confidence intervals

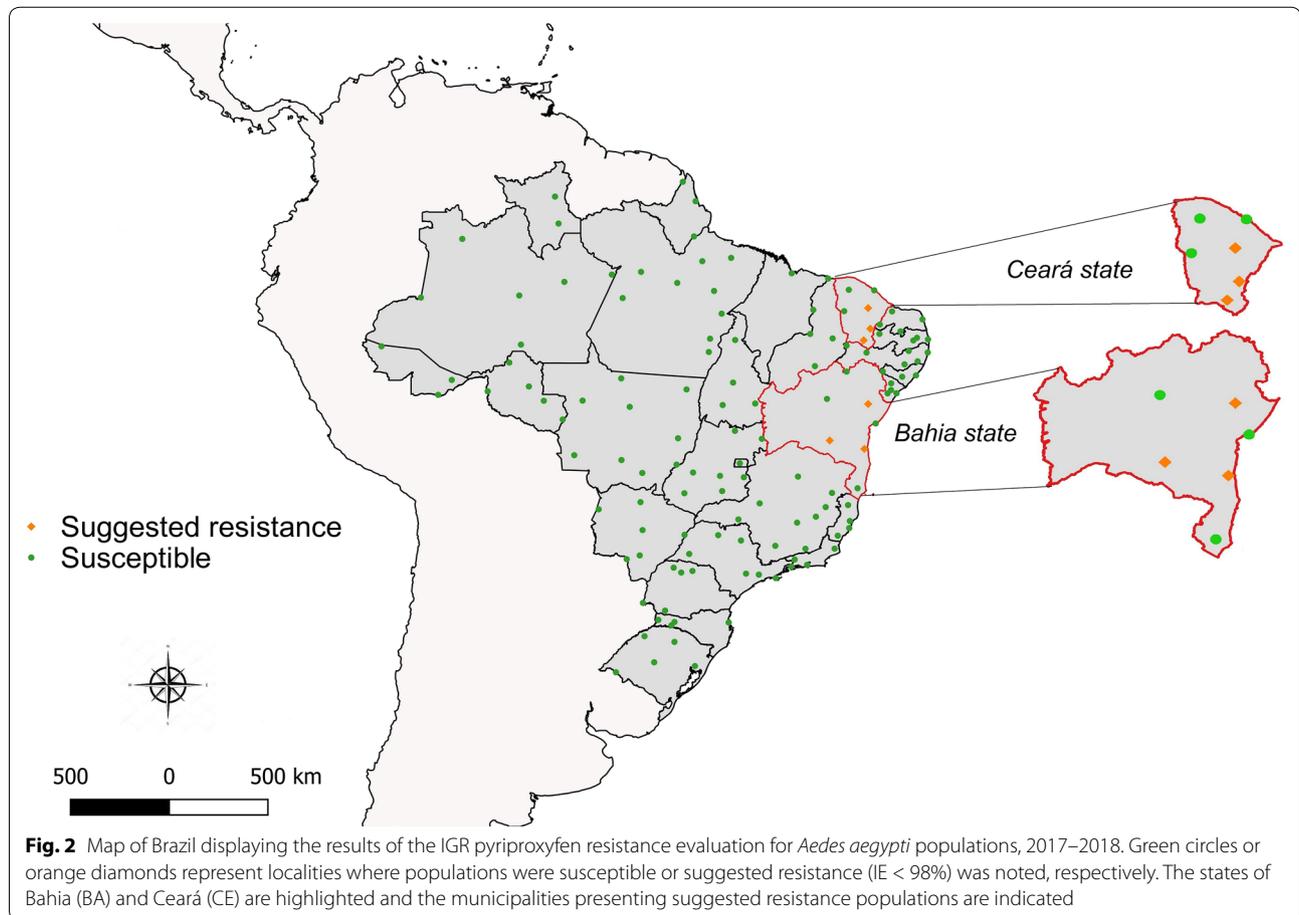
Emerging resistance to all the main classes of neurotoxic insecticide (CA, OC, OP and PY) has been detected in *Ae. aegypti* from the Americas, Africa and Asia [33]. The occurrence of susceptibility alterations concerning IGR, the most recently adopted class of insecticides, reinforces the importance of using integrated tools that can contribute to reduce the need for chemical vector control, modifying arbovirus transmission determinants, such as sustainable environmental management and education actions [34]. Lesser use of chemical insecticides reduces the risk of associated factors, such as ecological imbalances, secondary pest outbreaks and harmful effects to human health and to other non-target animals [35].

An alert is required concerning the high frequency of populations also comprising *Ae. albopictus* (59.8%). Our sampling was performed on the grounds of houses in urban territories, evidencing the significant expansion of this species in the country since its first record in 1986, in rural areas [36]. Further studies are recommended to better understand the role of *Ae. albopictus* in arbovirus transmissions in Brazil. In parallel, the monitoring of insecticide *Ae. aegypti* resistance should also consider *Ae. albopictus* populations.

Finally, the evaluation of all 146 planned populations was not possible, since some samplings were not carried out due to operational difficulties, while the laboratory maintenance of some populations was prevented by insufficient or inadequate egg preservation, hindering hatching. This limitation was minimized by providing the necessary material to all participants and preparing a video in order to standardize sampling and laboratory transport procedures.

**Conclusions**

The challenge posed by vector resistance to different active ingredients available for their chemical control reinforces the importance of implementing Integrated Management Strategies, which prioritize mechanical control and educational actions, with the aim of decreasing the number of breeding sites [1, 2]. A well-structured mosquito insecticide resistance monitoring system is essential for a sustainable, integrated and



**Table 4** Dose–response bioassays on *Aedes aegypti* populations resistant to pyriproxyfen in Brazil, 2017–2018

Region	State	Population/City	El <sub>50</sub> (μg/l) <sup>a</sup> (CI)	El <sub>95</sub> (μg/l) <sup>a</sup> (CI)	RR <sub>50</sub> <sup>b</sup>	RR <sub>95</sub> <sup>b</sup>	Slope	Resistance level <sup>c</sup>
Northeast	Bahia	Rockefeller	0.0621 (0.0620–0.0639)	0.1190 (0.1137–0.1253)	1.00	1.00	5.81	–
		Serrinha	0.1207 (0.0312–0.4665)	0.4257 (0.1711–1.0595)	1.95	3.58	3.00	Low
		Itabuna	0.1223 (0.0942–0.1588)	0.4056 (0.2776–0.5927)	1.97	3.41	3.16	Low
	Ceará	Brumado	0.0666 (0.0510–0.0871)	0.3160 (0.2699–0.3699)	1.07	2.66	2.43	Low
		Juazeiro do Norte	0.0835 (0.0498–0.1399)	0.2495 (0.1884–0.3304)	1.35	2.10	3.46	Low
		Quixadá	0.0900 (0.0800–0.0900)	0.2200 (0.2000–0.2400)	1.45	1.85	4.31	Low
		Icó	0.0700 (0.0600–0.0800)	0.1800 (0.1500–0.2200)	1.13	1.51	4.25	Low

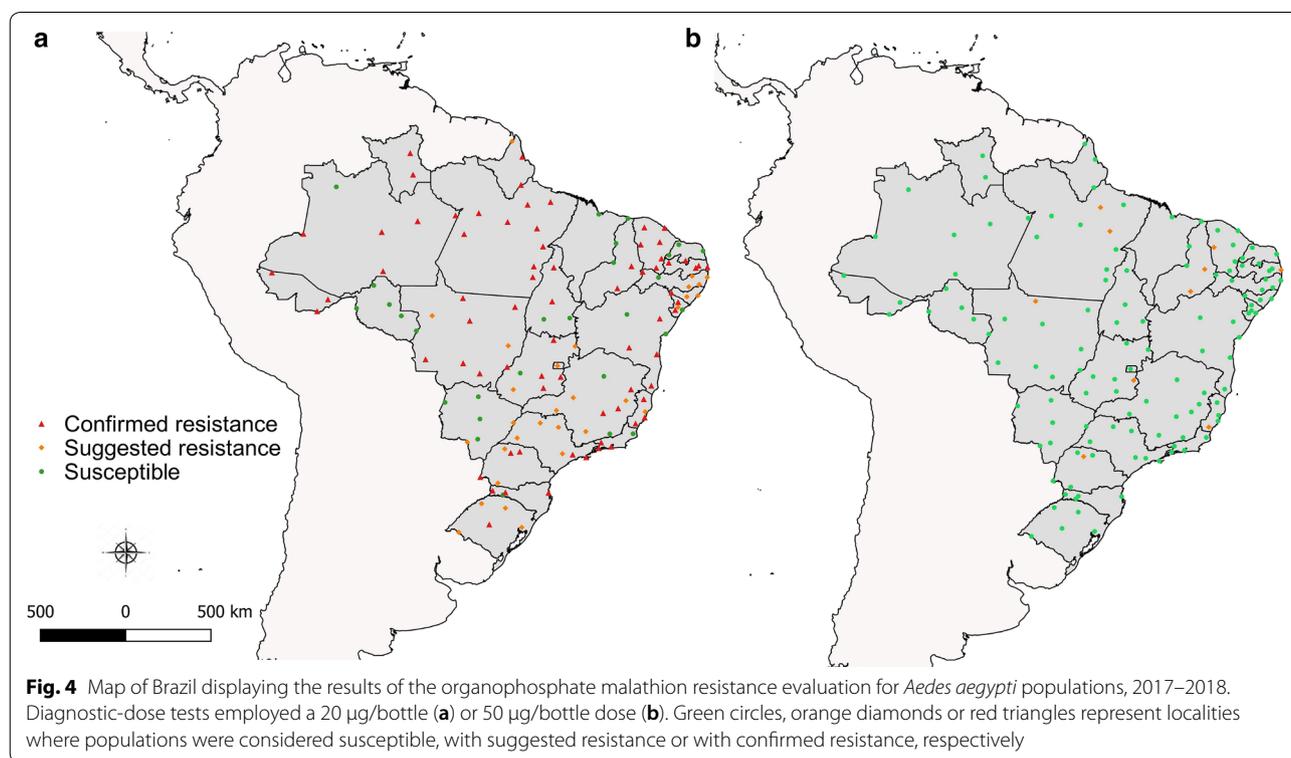
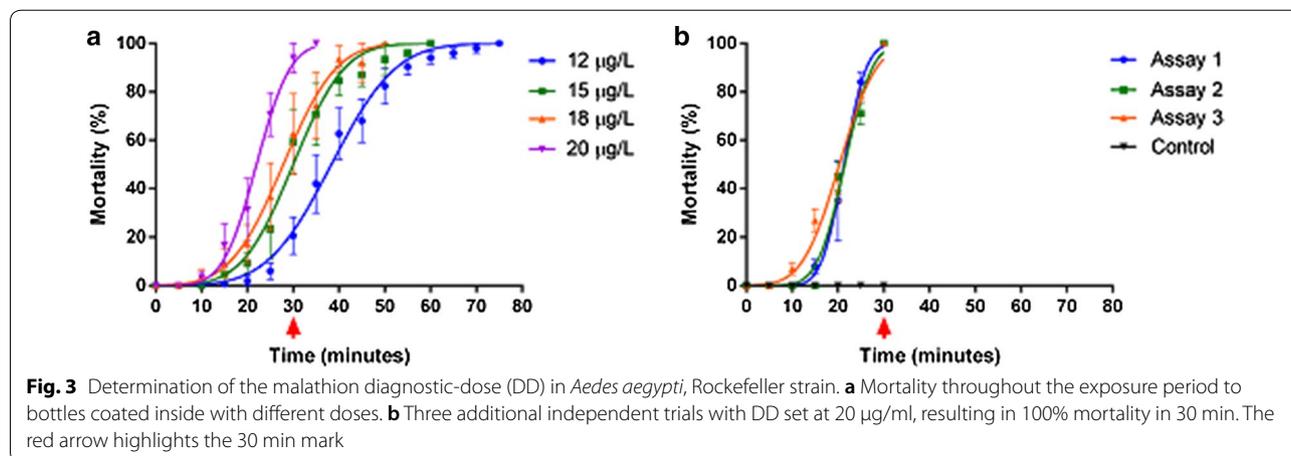
<sup>a</sup> El<sub>50</sub> and El<sub>95</sub>: inhibition of 50% and 95% adult emergence pyriproxyfen concentrations, respectively (CI: confidence intervals)

<sup>b</sup> RR<sub>50</sub> and RR<sub>95</sub>: resistance ratios

<sup>c</sup> Resistance level: RR<sub>95</sub> < 5.0: low; RR<sub>95</sub> 5.0–10.0: moderate; RR<sub>95</sub> > 10.0: high Mazzarri & Georghiou [26]

effective plan based on chemical vector control strategies. We described the sampling and standardization activities of insecticide resistance monitoring tests for *Ae. aegypti* from 132 Brazilian localities between 2017 and 2018, discussing their results in the light of knowledge acquired since the first monitoring round carried

*Leishmania* vectors was implemented [32]. The present study demonstrated resistance to malathion in most of the evaluated mosquito populations with the 20 μg/bottle DD. Therefore, chemical control against *Ae. aegypti* is crucially threatened in most Brazil territory, as long as no other alternative compound is available.



out in 1999. We currently recommend the substitution of pyriproxyfen for an alternative larvicide class in areas where susceptibility changes were detected, in order to preserve the efficacy of this IGR. Regarding adulticides, resistance to malathion was as widespread in all Brazilian regions through laboratory-based DD assessments. Therefore, an alternative class of insecticide should be used to control adult mosquitos, also considering the previously noted history of pyrethroid resistance in Brazil. Resistance monitoring and the evaluation of new products must be performed continuously in locations

that represent Brazil’s geographical, climatic and urban diversity.

**Abbreviations**

BPU: Benzo-phenyl urea; Bti: *Bacillus thuringiensis*; CA: Carbamate; CDC: Centers for Disease Control and Prevention; DD: Diagnostic dose; DR: Dose-response; EI: Adult emergence inhibition; F1: First generation; F2: Second generation; FIOCRUZ: Oswaldo Cruz Foundation; IGR: Insect growth regulator; IOC: Oswaldo Cruz Institute; IR: Insecticide resistance; LAFICAVE: Laboratory of Physiology and Arthropod Control Vectors; LD: Lethal dose; LENa: Laboratory of Applied Entomology; MoH: Ministry of Health; MoReNAa: National Network for Monitoring the Resistance of *Aedes aegypti* to Insecticides; PNCD: National

Dengue Control Program; OP: Organophosphate; PY: Pyrethroid; RIDL: Release of insects with dominant lethality; RR: Resistance ratio; SIT: Sterile insect technique; SUCEN: Endemic Control Superintendence; WHO: World Health Organization; WP: Wettable powder.

#### Acknowledgments

The authors wish to thank the municipal teams involved in the bioassay sample collections, the coordination state teams, the laboratory teams that conducted the tests and the Ministry of Health for making the data available for this study.

#### Authors' contributions

JBPL and KBC performed the conceptualization and funding acquisition. JBPL, MLGM and MTMA provided supervision. KBC wrote an original draft of the manuscript. DFB provided formal analysis and methodology. JBPL and CMR conducted project administration. CMR and DFB provided quality management. MTO, JBPL, MLGM, MTMA, AJM, DFB, CMR and LSD were involved in writing, review and editing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Funding

General Coordination of Arboviruses Surveillance/Ministry of Health (Brasília, DF, Brazil) provided financial support for the survey through Agreement/TED/Commitment Term No. 105/2016 (National Health Fund), process number 25030,000852/2016-46. The Oswaldo Cruz Foundation provided funding for the publication. The funders had no role in the design of the study, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

#### Availability of data and materials

Data supporting the conclusions of this article are included within the article. The datasets required to reproduce the analyses and results presented herein are available from the corresponding author upon reasonable request.

#### Ethics approval and consent to participate

Artificial feeding of *Ae. aegypti* authorized by the Fiocruz Ethics Committee on the Use of Animals (authorizations LW-20/14 and L-004/2018).

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Author details

<sup>1</sup> Coordenação Geral de Vigilância de Abovíroses, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Edifício PO 700, SRTV 702, Via W 5 Norte, Brasília/Distrito Federal CEP 70723-040, Brazil. <sup>2</sup> Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília/Distrito Federal CEP 70910-900, Brazil. <sup>3</sup> Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, Rua Francisco Manuel no 102, Bairro Benfica, Rio de Janeiro/Rio de Janeiro State CEP 20911-270, Brazil. <sup>4</sup> Laboratório de Entomologia Aplicada, Superintendência de Controle de Endemias, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Avenida Santo Antônio no 1627, Bairro Somenzari, Marília/São Paulo CEP 17506-970, Brasil.

Received: 6 July 2020 Accepted: 14 October 2020

Published online: 27 October 2020

#### References

- Roiz D, Wilson AL, Scott TW, Fonseca DM, Jourdain F, et al. Integrated *Aedes* management for the control of *Aedes*-borne diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12:e0006845.
- Valle D, Belinato TA, Martins AJ. Controle químico de *Aedes aegypti*, resistência a inseticidas e alternativas. In: Valle D, Pimenta DN, Cunha RV, editors. *Dengue: Teorias e Práticas*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2015. p. 93–126.
- Lima EP, Paiva MH, de Araújo AP, da Silva EV, da Silva UM, de Oliveira LN, et al. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará. *Brazil Parasit Vectors*. 2011;4:5.
- MS/SVS. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue. Brasília: Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde; 2009. [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes\\_nacionais\\_prevencao\\_controle\\_dengue.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf).
- SINAN Online/MS. Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Ministério da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde. <https://portalsina.saude.gov.br/>.
- Roush RT. Designing resistance management programs: how can you choose? *Pestic Sci*. 1989;26:423–41.
- Guedes RNC, Beins K, Navarro Costa D, Coelho GE, Bezerra HSdS. Patterns of insecticide resistance in *Aedes aegypti*: meta-analyses of surveys in Latin America and the Caribbean. *Pest Manag Sci*. 2020;76:2144–57.
- Macoris MLG, Camargo MF, Silva IG, Takaku L, Andrighetti MTM. Modificação da susceptibilidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* ao temefós. *Rev Pat Trop*. 1995;24:31–40.
- Valle D, Bellinato DF, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Junior AJM. Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019;114:e180544.
- da-Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:441–4.
- MS/SVS/CGPNCD. Reunião Técnica para Discutir Status de Resistência de *Aedes aegypti*. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue; 2006.
- Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: surveillance, resistance monitoring, and control alternatives in Brazil. *Epidemiol Serv Saúde*. 2007;16:295–302.
- Marcombe S, Darriet F, Agnew P, Etienne M, Yp-Tcha MM, Yebakima A, et al. Field efficacy of new larvicide products for control of multi-resistant *Aedes aegypti* populations in Martinique (French West Indies). *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84:1118–212.
- Marcombe S, Farajollahi A, Healy SP, Clark GG, Fonseca DM. Insecticide resistance status of United States populations of *Aedes albopictus* and mechanisms involved. *PLoS ONE*. 2014;9:e101992.
- Lau KW, Chen CD, Lee HL, Norma-Rashid Y, Sofian-Azirun M. Evaluation of insect growth regulators against field-collected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Malaysia. *J Med Entomol*. 2015;52:199–206.
- Su T, Thieme J, Lura T, Cheng ML, Brown MQ. Susceptibility profile of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) from Montclair, California, to commonly used pesticides, with note on resistance to pyriproxyfen. *J Med Entomol*. 2019;56:1047–54.
- Macoris MLG, Andrighetti MTM, Otrera VCG, Carvalho LR, Júnior ALC, Brogdon WG. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:895–900.
- Goindin D, Delannay C, Gelasse A, et al. Levels of insecticide resistance to deltamethrin, malathion, and temephos, and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from the Guadeloupe and Saint Martin islands (French West Indies). *Infect Dis Poverty*. 2017;6:38.
- Chediak M, G Pimenta Jr F, Coelho GE, Braga IA, Lima JBP, Cavalcante KRLJ, et al. Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111:311–21.
- Adegas MG, Barroso-Krause C, Lima JBP, et al. Parâmetros de Biossegurança para Insetários e Infectorios de Vetores: aplicação e adaptação das normas gerais para laboratórios definidas pela Comissão Técnica de Biossegurança da Fiocruz. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2005. <https://www.inctem.bioqmed.ufjf.br/index.php/pt/biblioteca/2964-parametros-de-biosseguranca-para-insetarios-e-infectorios-de-vetores-do-instituto-oswaldo-cruz>.
- Kuno G. Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. *J Med Entomol*. 2010;47:957–71.
- WHO. Monitoring and managing insecticide resistance in *Aedes* mosquito populations. Interim guidance for entomologists. Geneva: World Health Organization; 2016. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204588>.

23. Raymond M. Presentation d'une programme d'analyse logprobit pour microordinateur. *Cah ORSTOM Ser Ent Med Parasitol.* 1985;22:117–21.
24. WHO. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes, 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2016. <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241511575/en/>.
25. Finney DJ. Probit analysis. London: Cambridge University; 1971.
26. Mazzarri 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;11:315–22.
27. Andrighetti MTM, Cerone F, Riguetti M, Galvani KC, Macoris MLG. Effect of pyriproxyfen in *Aedes aegypti* populations with different levels of susceptibility to the organophosphate temephos. *Dengue Bull.* 2008;32:186–98.
28. Fonseca EOL, Macoris mLG, Santos RF, Morato DG, Isabel MDSS, Cerqueira NA, et al. Estudo experimental sobre a ação de larvicidas em populações de *Aedes aegypti* do município de Itabuna, Bahia, em condições simuladas de campo. *Epidemiol Serviços Saúde.* 2019;28:e2017316.
29. Linss JGB, Brito LP, Garcia GA, Araki AS, Bruno RV, Lima JBP, et al. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasit Vectors.* 2014;7:25.
30. Macoris MLG, Andrighetti MTM, Nalon KCR, Garbeloto VC, Caldas AL Jr. Standardization of bioassays for monitoring resistance to insecticides in *Aedes aegypti*. *Deng Bul.* 2005;29:176–82.
31. Macoris MLG, Andrighetti MTM, Wanderley DMV, Ribolla PEM. Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the State of São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47:573–8.
32. WHO. Prequalification vector control. Prequalified products 11 Apr 2019. <https://www.who.int/pq-vector-control/prequalified-lists/en/>. Accessed 2 Dec 2019.
33. Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, Ng LC, Koou SY, Dufour I, et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11:e0005625.
34. Macoris MLG, Martins AJ, Andrighetti MTM, Lima JBP, Valle D. Pyrethroid resistance persists after ten years without usage against *Aedes aegypti* in governmental campaigns: lessons from São Paulo State. *Brazil PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12:e0006390.
35. Wilson AL, Courtenay O, Kelly-Hope LA, Scott TW, Takken W, Torr SJ, et al. The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14:e0007831.
36. Achee NL, Grieco JP, Vatandoost H, Seixas G, Pinto J, Ching-Ng L, et al. Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13:e0006822. Erratum in: *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13:e0007275.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



## Assessment of insecticide resistance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations to insect growth regulator pyriproxyfen, in the northeast region of Brazil

Kauara B. Campos<sup>1,2,3,4</sup>, Abdullah A. Alomar<sup>1</sup>, Bradley H. Eastmond<sup>1</sup>, Marcos T. Obara<sup>2</sup>,  
Luciana dos S. Dias<sup>4</sup>, Rafi U. Rahman<sup>4</sup>, and Barry W. Alto<sup>1✉</sup>

<sup>1</sup>Entomology and Nematology Department, Florida Medical Entomology Laboratory, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Vero Beach, FL 32962, USA [bwalto@ufl.edu](mailto:bwalto@ufl.edu)

<sup>2</sup>Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília/Distrito Federal CEP 70910-900, Brazil

<sup>3</sup>Coordenação Geral de Vigilância de Aboviroses, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília/ Distrito Federal CEP 70723-040, Brazil

<sup>4</sup>Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, Bairro Benfica, Rio de Janeiro/Rio de Janeiro State CEP 20911-270, Brazil

Received 29 July 2022; Accepted 21 November 2022

**ABSTRACT:** Vector control has been an essential strategy in Brazil to manage vector-borne diseases, and the use of insecticides plays an important role in this effort. Pyriproxyfen (PPF) has become a common insect growth regulator used to control juvenile stages of mosquitoes by disturbing their growth and development. This study assesses the susceptibility and resistance status of Brazilian *Ae. aegypti* populations that previously showed low resistance levels to PPF. Eggs of *Ae. aegypti* were collected from six cities located in the northeast states of Ceará (Quixadá, Icó, and Juazeiro do Norte), and Bahia (Itabuna, Brumado, and Serrinha). We used the *Ae. aegypti* Rockefeller strain as an experimental control and a strain known to be susceptible to insecticides. Inhibition of emergence rates by 50% of *Ae. aegypti* populations varied from 0.0098-0.046 µg/L. Mosquitoes from Icó, Serrinha, and Brumado showed low resistance levels [resistance ratio (RR<sub>50</sub>) = 2.33, 4.52, and 4.83, respectively], whereas moderate levels of resistance were detected in populations from Juazeiro do Norte (RR<sub>50</sub> = 5.83) and Itabuna (RR<sub>50</sub> = 7.88). *Aedes aegypti* collected from the Quixadá population showed a high resistance level to pyriproxyfen (RR<sub>50</sub> = 11). The evolution of resistance in Brazilian *Ae. aegypti* populations to PPF can compromise vector control efforts. Continuous monitoring of insecticide resistance in *Ae. aegypti* is essential for making timely management decisions for effective vector control and management. *Journal of Vector Ecology* 48 (1): 12-18. 2023.

**Keyword Index:** Resistance, *Aedes aegypti*, Brazil, pyriproxyfen, emergence inhibition, mosquito control.

### INTRODUCTION

*Aedes aegypti* is considered to be the primary vector species of emerging arboviruses, including dengue, chikungunya, and Zika viruses. Close to four billion people are estimated to be at risk of dengue infection in 128 countries, mainly from tropical and subtropical regions of Africa, the Americas, the eastern Mediterranean, Southeast Asia, and the Western Pacific (Brady and Hay 2020). More than 17 million dengue cases were reported in the Americas between 2012 and 2021, of which 64% were concentrated in Brazil, the country responsible for registering more than half of the 9,056 dengue-related deaths in the South American continent during this period (PAHO 2022). In Brazil, the emergence of new dengue virus serotypes increases the risk of new and more severe infections, such as dengue hemorrhagic fever, especially in vulnerable areas (Ribeiro et al. 2021, Cunha et al. 2021).

Zika virus infection has also been associated with severe congenital malformations (microcephaly) in newborn babies (Rasmussen et al. 2016). The country confirmed 1,834 cases of the congenital syndrome associated with Zika virus infection

between 2015 and 2021. Zika virus and other emerging arboviruses have increased in incidence in recent decades around the world, and their circulation may be concomitant in the same region during epidemics (Dick et al. 2012, Roiz et al. 2018). Vector-borne diseases exacerbate poverty, cause a loss in work and school days, increase the cost of health care, and undermine economic productivity (Parra-Henao et al. 2021).

Vaccines are considered to be the leading way to manage infectious disease outbreaks (Excler et al. 2021). However, considering that few effective vaccines are available for most arboviruses, vector control remains the essential method for preventing human infection and outbreaks of arboviruses (Domingo et al. 2008, Achee et al. 2015). Integrated mosquito management is regarded as one of the best methods to control vectors, which includes regular community involvement, surveillance of vectors and pathogens, mapping, source reduction, biological and chemical controls, and monitoring of the effectiveness and resistance of mosquito vectors to insecticides.

The evolution of insecticide resistance is related to the selective pressure for the continuous and intensive use

of the same active ingredient in the chemical control of a population, and its frequency can reach levels capable of compromising the effectiveness of the product used (Roush 1989). Resistance to organophosphates and pyrethroids in *Ae. aegypti* is widespread in many countries, including Brazil (Moyes et al. 2017).

Pyriproxyfen (PPF) is an insect growth regulator that can be used to interrupt the metamorphosis and reproduction of mosquitoes (Maoz et al. 2017, Alomar and Alto 2021, 2022). The use of PPF at low concentrations can inhibit the juvenile stages of *Ae. aegypti* from emergence to adulthood, which is expected to lower recruitment of adults in a population (Alomar et al. 2020). In Brazil, the employment of PPF against *Ae. aegypti* was started in 2014 in response to the dengue virus outbreaks, and resistance to the PPF was detected between 2017 and 2018 in populations collected from municipalities in the northeast region of the country (Campos et al. 2020). Continuous monitoring of mosquito populations for insecticide resistance is critical for insecticide resistance management strategies and prolonging the effectiveness of vector-borne disease control (Campos et al. 2022). Therefore, the present study reports the current resistance status to PPF in *Ae. aegypti* populations from the northeast region of Brazil.

## MATERIALS AND METHODS

### Collection method

Field collections of *Ae. aegypti* occurred in municipalities where resistance to PPF was detected in a previous study (Campos et al. 2020). The collections of mosquitoes from the geographic populations were made two years following the initial assessment of PPF resistance reported by Campos et al. (2020). These populations were derived from six cities located in the northeast states of Ceará (Quixadá, Icó, and Juazeiro do Norte), and Bahia (Itabuna, Brumado, and Serrinha), Brazil (Figure 1).

*Aedes aegypti* field populations were collected in February

and March, 2020 by the Endemic Control Agents of each city using 100 oviposition traps (ovitraps) in towns with up to 50,000 houses and 150 ovitraps in cities with up to 200,000 homes following the MoReNAa Network methodology (Lima et al. 2003, Braga and Valle 2007). To install the traps, houses were evenly distributed in a grid pattern, selecting complete coverage of the urban territory to include regions presenting different infestation levels. The Endemic Control Agents installed one trap in a shaded area on the grounds of each selected house. Each ovitrap was filled with 300 ml of tap water, 1 ml yeast extract solution (0.04%) as an attractant for gravid females, and a single wooden paddle as an oviposition substrate. Ovitrap were maintained in the households for 15 days, and paddles and attractive solutions were changed at the end of the first week. Paddles containing the eggs were air-dried for two to three days prior to being sent to the Laboratory of Physiology and Control of Arthropod Vector (Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, LAFICAVE), at the Oswaldo Cruz Institute (IOC/Fiocruz), Rio de Janeiro/ RJ.

### Mosquito rearing

Paddles containing eggs were submerged in dechlorinated water. Hatched larvae were transferred to basins (33 × 24 × 8 cm) containing 1 liter of dechlorinated water and 100 mg of fish food (TetraMin® Tropical Granules, Tetra Marine Granules; Tetra GmbH, Melle, Germany), with supplementary food added every three days. After the eggs hatched, ten basins with 500 larvae of each population were used to establish mosquito colonies. In some cases, less than 500 larvae were available, and so all available larvae were used to establish the colony. Pupae from field populations were collected and placed in tubes with cotton plugs to allow for the capture of newly emerged adults and the identification of species. Adult mosquitoes were maintained in cylindrical carton cages (16 cm in diameter × 18 cm high) with access to a 10% sucrose solution through cotton wicks. To produce

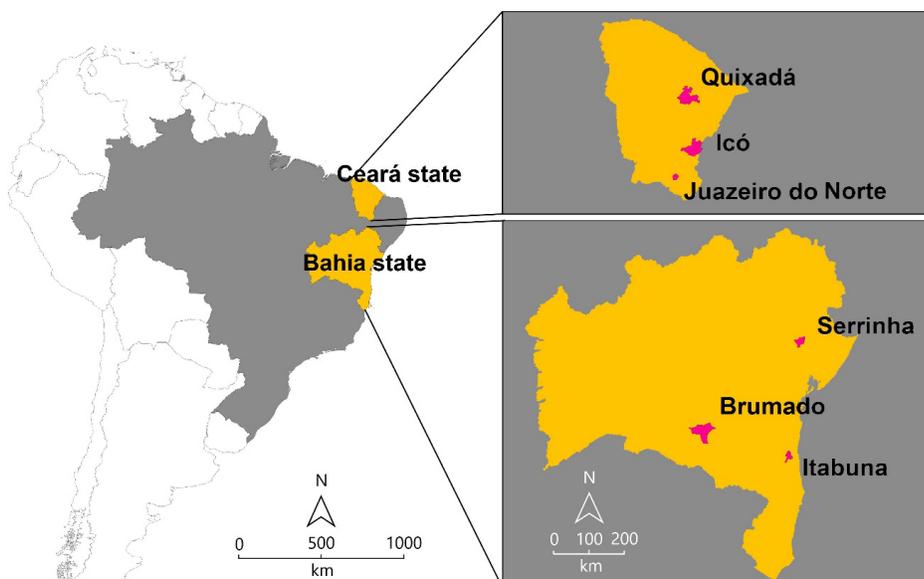


Figure 1. Map of Brazil showing the geographic locations where mosquito populations were sampled from Ceara and Bahia states.

eggs for the next generation, we offered blood meals (rabbit blood) containing sodium citrate as an anticoagulant through Hemotek reservoir membrane feeders (Discovery Workshops, Accrington, UK) preheated to 37° C for 1 h to females. All mosquito colonies were held at 26 ± 2° C and 70 ± 10% RH. The *Ae. aegypti* Rockefeller strain was used as an experimental control and a strain known to be susceptible to insecticides (Kuno 2014). The reference strain was used to determine the resistance ratio (RR).

#### Pyriproxyfen preparation, toxicity bioassays, and resistance ratio estimation

The analytical standard of pyriproxyfen (Sigma-Aldrich, Co., St Louis, U.S.A.) was dissolved in acetone and further serially diluted in ethanol to prepare different concentrations for the toxicity bioassays (Campos et al. 2020). The dose-response (DR) bioassays were conducted at the Florida Medical Entomology Laboratory (FMEL) in Vero Beach, FL. Eggs from field populations (F3 generation) were sent to FMEL after receiving an export authorization by the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). We used the F4 generation for the bioassays due to the delay in performing experiments resulting from the COVID-19 pandemic. Mosquitoes were reared for the next generation under similar conditions mentioned above before being subjected to the toxicity bioassays. Six field populations and an insecticide-susceptible strain of *Ae. aegypti* (Rockefeller) were subjected to DR bioassays to quantify their resistance levels following procedures described in the WHO guidelines for larvicide bioassays, with some modifications. Briefly, forty 3rd-4th instar larvae (four replicates with ten larvae each) were exposed to ten concentrations ranging from 0.0008 to 0.05 µg/L, as used in the previous tests reported by Campos and collaborators (Campos et al. 2020). Four tests were performed at different time points. Larval food (10 mg) was added on the initial day of exposure during bioassays, and 5 mg of supplementary food was added two days later. Adult inhibition of emergence (IE) percentages (i.e., mortality) were calculated at the end of the bioassays when all control pupae had emerged into adults (expressed as a percentage of the original cohort of mosquitoes). Adults

were considered to have survived if they were free from the pupal exuviae and capable of flight when gently touched. A total of 440 larvae were evaluated in each DR test, including their replicates, requiring 1,760 larvae from each population for the four experimental replicates.

#### Data analysis

Inhibition of emergence of 50% and 90% of adults (IE<sub>50</sub> and IE<sub>90</sub>) of each population was determined using probit analysis (SAS version 9.22, SAS Institute Inc., Cary, NC, U.S.A.). Mortality was corrected using Abbot's formula. Resistance ratios (RR<sub>50</sub>) were obtained by dividing the IE<sub>50</sub> of each mosquito population by the equivalent EI of the Rockefeller reference strain. Resistance levels were classified as low (<5), moderate (5.0–10.0), or high (>10.0).

## RESULTS

The numbers of traps and paddles installed, positive paddles, and eggs obtained for each field population are summarized in Table 1. The percentage of inhibition of adult emergence for the susceptible strain (Rockefeller) under our laboratory conditions was estimated at IE<sub>50</sub> = 0.0042 (95% CI [0.0035 – 0.0048]) and IE<sub>90</sub> = 0.0086 (95% CI [0.0074 – 0.0110]) (Table 2). Dose-response bioassays indicated that *Ae. aegypti* populations from the Brazilian northeastern cities of Itabuna, Brumado, and Serrinha (Bahia), and Quixadá, Juazeiro do Norte, and Icó (Ceará), presented resistance ratios (RR<sub>50</sub>) ranging from 2.33 to 11.00 and RR<sub>90</sub> ranging from 6.58 – 19.24 (Table 2). Considering the RR<sub>50</sub> values, the populations from the cities of Brumado and Serrinha (Bahia) and Icó (Ceará), had low resistance ratios, indicating low resistance/high susceptibility to PPF. In contrast, populations from the cities of Itabuna (Bahia) and Juazeiro do Norte (Ceará) showed moderate resistance, and the population from the city of Quixadá (Ceará) showed high resistance to PPF (Figure 2).

Table 1. Sampling of *Aedes aegypti* field populations from Brazil.

State	Population/City	Ovitrap	Paddles		Eggs	
			total	pp <sup>a</sup>	total	mean eggs in pp
Bahia	Itabuna	150	300	162	11,444	70.6
	Brumado	100	220	154	24,327	158.0
	Serrinha	100	183	91	3,350	36.8
Ceará	Quixadá	100	210	73	3,520	48.2
	Juazeiro do Norte	150	300	210	16,694	79.5
	Icó	100	200	155	10,508	67.8

Table 2. Dose-response bioassays of *Ae. aegypti* populations resistant to pyriproxyfen in Brazil. <sup>a</sup>Resistance level:  $RR_{50} < 5.0$ : low;  $RR_{50}$  5.0-10.0: moderate;  $RR_{50} > 10.0$ : high. <sup>b</sup>Campos et al. 2020.

State	Population/ City	2020					2017/2018 <sup>b</sup>		
		EI <sub>50</sub> (µg/L) (CI)	EI <sub>90</sub> (µg/L) (CI)	RR <sub>50</sub>	RR <sub>90</sub>	Slope	Resistance level <sup>a</sup>	RR <sub>50</sub>	Resistance level <sup>a</sup>
Bahia	Rockefeller	0.0042 (0.0035- 0.0048)	0.0086 (0.0074- 0.0110)	1.00	1.00	4.09	-	1.00	-
	Itabuna	0.0331 (0.0313- 0.0349)	0.0696 (0.0646- 0.0758)	7.88	8.09	3.97	Moderate	1.97	Low
	Brumado	0.0203 (0.0117- 0.0285)	0.0566 (0.0389- 0.1272)	4.83	6.58	2.87	Low	1.07	Low
	Serrinha	0.0190 (0.0087- 0.0363)	0.1655 (0.0762- 0.7673)	4.52	19.24	1.36	Low	1.95	Low
Ceará	Quixadá	0.0462 (0.0298- 0.0646)	0.1373 (0.0945- 0.2653)	11.00	15.97	2.71	High	1.45	Low
	Juazeiro do Norte	0.0245 (0.0230- 0.0261)	0.0570 (0.0527- 0.0621)	5.83	6.63	3.50	Moderate	1.35	Low
	Icó	0.0098 (0.0046- 0.0197)	0.1040 (0.0454- 0.4736)	2.33	12.09	1.25	Low	1.13	Low

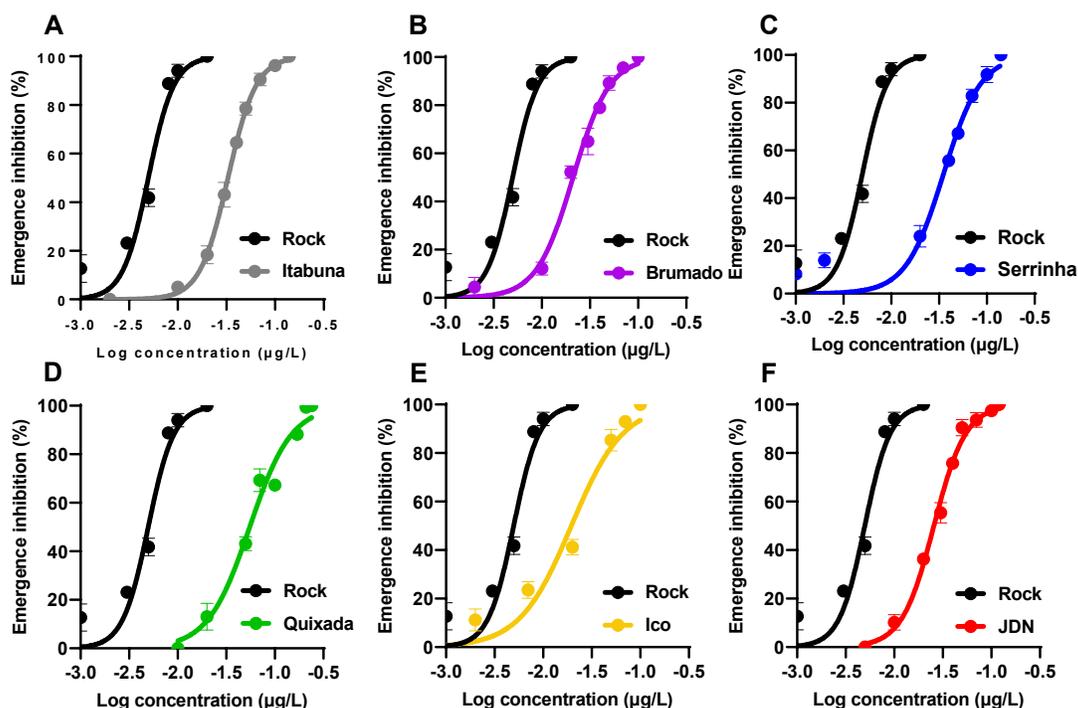


Figure 2. Pyriproxyfen-induced adult emergence inhibition for *Ae. aegypti* after exposure to a range of doses. Doses are represented as  $\log_{10}$  transformation of  $\mu\text{g/L}$ . Lines represent the best fit for data. Dots represent an average adult emergence inhibition from four biological replicates. Error bars denote standard error. Further description of the data set is in Table 2.

## DISCUSSION

The aim of our study was to reassess PPF resistance in field populations of *Ae. aegypti* from the Brazilian northeastern cities of Itabuna, Brumado, and Serrinha (Bahia), and Quixadá, Icó, and Juazeiro do Norte (Ceará). *Aedes aegypti* populations from these locations showed low resistance levels to PPF in an evaluation carried out previously during 2017 and 2018 (Campos et al. 2020). Considering the existence of few reports of resistance of *Ae. aegypti* to this larvicide, the present work allows for a relative assessment of changes in resistance ratios after the continued use of PPF for mosquito control for two additional years.

The  $RR_{50}$  values found in this study were 2.1 to 7.6 times higher than those reported for dose-response (quantitative) tests in 2017-2018. The higher values observed are consistent with the expectation that a greater proportion of individuals will carry resistance polymorphisms or alleles in response to continued selection (Liu 2015) through the application of PPF on a bimonthly frequency for two to three years. Comparing the resistance levels of the populations evaluated to those measured previously (Campos et al. 2020), where all had low levels of resistance, two of these populations had their levels increase to moderate resistance (Itabuna/Bahia and Juazeiro do Norte/Ceará), and one exhibited high resistance (Quixadá/Ceará). Other studies previously conducted in the Brazilian midwest region detected low and moderate resistance to PPF ( $RR_{50}$  1.42–2.21 and  $RR_{50}$  1.7–7.7) in *Ae. aegypti* populations (Moreira 2018, Carvalho et al. 2020). The low resistance of *Ae. aegypti* to PPF was also reported in Martinique ( $RR_{50}$  of 2.2), moderate resistance in Malaysia ( $RR_{50}$  of 6.1), and high in the U.S.A. ( $RR_{50}$  of 38.7) (Marcombe et al. 2011, Lau et al. 2015, Su et al. 2019), while there was no resistance to PPF in Pakistan (Rahman et al. 2021). As occurred in the previous study, some populations presented discrepant  $RR_{50}$  and  $RR_{90}$  values, represented by low slopes (Table 2), which suggests that the population is heterogeneous and resistance is developing in an initial process, with susceptible and resistant individuals.

Andrighetti et al. (2008) described resistance to PPF in populations from Salvador and Barreiras (Bahia State) and Bauru (São Paulo State) ( $RR_{50}$  of 6.5, 1.4, and 3.6, respectively) years before the beginning of the use of PPF for *Ae. aegypti* control in public health in Brazil. At the time, the populations showed respectively,  $RR_{50}$  of 11, 5.2, and 2.0 to temephos, and the authors suggested the possibility of cross-resistance between PPF and temephos (Andrighetti et al. 2008). The authors hypothesized that cross-resistance is attributable to increased metabolic detoxification of different enzymes possibly related to resistance to temephos [alpha and beta esterases, mixed function oxidases (MFO), and glutathione-S-transferase (GST), with activity found also altered in populations resistant to insect growth regulator (Andrighetti et al. 2008). Results of monitoring susceptibility of *Ae. aegypti* to temephos between 1985 and 2017 in Brazil showed that the highest resistance levels occurred in the northeast region, a similar region where we observed resistance to PPF. The  $RR_{95}$  to the temephos above 100 was found in 20% of evaluated cases (Valle et al. 2019).

In addition to the genetic differences between mosquito populations, we hypothesize that variations in the frequency or concentration of insecticide application may have contributed to variability in their resistance levels. An increase in insecticide application frequency generally occurs when entomological control activities are intensified during arbovirus outbreaks. In addition, changes in the applied concentrations can happen due to failures in the application process. An analysis of relative insecticide use can contribute to our understanding of the association with development of resistance; however, such data are not available for different municipalities. Identification of the specific factors influencing the evolution of resistance and mechanisms was beyond the scope of the study. Future studies should consider investigations of quantifying the relative use of insecticides in different municipalities and physiological mechanisms associated with resistance.

Here, we found  $RRs >5$  for *Ae. aegypti* Brazilian populations to PPF. Semi-field trials carried out by Macoris et al. (2014) showed that, for *Ae. aegypti* populations with  $RR >5$  to neurotoxin temephos, field control failures were considered evident. Larval control under field conditions was acceptable for populations with  $RR <3$  to temephos. However, studies investigating the functional significance of resistance levels to insect growth regulators in the field have not yet been reported. Consequently, further investigations into the impact of these results on vector control operations are needed. The emergence of resistance to newly developed insecticides draws attention to the need for regular monitoring of the susceptibility profile of local mosquito populations and planning control measures accordingly (Richards et al. 2020). In 2021, PPF was gradually replaced by the biological larvicide Spinosad, derived from the fermentation of the bacterium *Saccharopolyspora spinosa*, for *Ae. aegypti* larval control in Brazil. The decision to alternate the active ingredient used was made by the Brazilian Ministry of Health, considering the detection of PPF resistance selection in an initial process and the small number of prequalified larvicides (Campos et al. 2020).

In addition to potential negative impacts of insecticides on the environment, inadequate application procedures may result in further selective pressure on the target insect vector as well as nontarget organisms (Maciel-de-Freitas et al. 2014, Chediak et al. 2016, Macoris et al. 2018). Rotating the use of insecticides and integrated vector management strategies should be implemented to mitigate the development of insecticide resistance. The prioritization of mechanical control and community mobilization to reduce breeding sites is of fundamental importance for the effectiveness and sustainability of vector control (Roiz et al. 2018). Mapping the most significant risk areas within the territories is a tool that aims to direct surveillance actions promptly, which seeks to reduce the intensity and speed of epidemic dispersion, contributing to the more rational use of chemical control (Honório 2017, Siqueira et al. 2022).

The sampling of mosquito populations that had previously been susceptible to the larvicide PPF was impeded by operational problems and the COVID-19

pandemic. Specifically, the social isolation imposed the suspension of home visits by Endemic Control Agents in some municipalities. We acknowledge that the lack of sampling of other populations that did not show altered PPF susceptibility was a limitation of this work. Also, the lack of an investigation of the mechanism(s) for evolution of resistance (e.g., biochemical activity of enzymes) in these mosquito populations was beyond the scope of the current study and a limitation.

Our study demonstrates the evolution of PPF resistance in *Ae. aegypti* populations in a short period, highlighting the importance of regular and systematic monitoring of target vector populations for informed vector control actions to be used. Implementing integrated management measures, which contribute to reducing the need of insecticide application for vector control, becomes increasingly necessary with the emergence of resistance to newly developed insecticides. It is also essential to improve basic sanitation conditions, especially in areas with greater risk for arbovirus transmission, to reduce breeding sites sustainably.

#### Acknowledgments

The authors thank the municipal teams involved in the bioassay sample collections, the coordination state teams, and the LAFICAVE/FIOCRUZ team that assisted with mosquito rearing. The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' Contributions

KBC performed the conceptualization. BWA performed the funding acquisition. KBC and LdSD provided methodology. LdSD performed colony establishment. KBC and BHE performed the bioassays. BWA and MTO provided supervision. KBC wrote an original draft of the manuscript. AAA and RUR provided formal analysis. All authors were involved in writing, review and editing the manuscript, read and approved the final manuscript.

#### REFERENCES CITED

- Achee, N.L., F. Gould, T.A. Perkins, R.C. Reiner Jr, A.C. Morrison, S.A. Ritchie, D.J. Gubler, R. Teyssou, and T.W. Scott. 2015. A critical assessment of vector control for dengue prevention. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9: e0003655.
- Alomar, A.A., and B.W. Alto. 2021. Mosquito responses to lethal and nonlethal effects of predation and an insect growth regulator. *Ecosphere* 12: e03452.
- Alomar, A.A. and B.W. Alto. 2022. Evaluation of pyriproxyfen effects on *Aedes aegypti* and predatory mosquito *Toxorhynchites rutilus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 59: 585-590.
- Alomar, A.A., B.H. Eastmond, and B.W. Alto. 2020. The effects of exposure to pyriproxyfen and predation on Zika virus infection and transmission in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14: e0008846.
- Andrighetti, M.T.M., F. Cerone, M. Riguetti, K.C. Galvani, and M.d.L.d.G. Macoris. 2008. Effect of pyriproxyfen in *Aedes aegypti* populations with different levels of susceptibility to the organophosphate temephos. *Dengue Bull.* 32:186-198.
- Brady, O.J. and S.I. Hay. 2020. The global expansion of dengue: how *Aedes aegypti* mosquitoes enabled the first pandemic arbovirus. *Annu. Rev. Entomol.* 65: 191-208.
- Braga, I.A. and D. Valle. 2007. *Aedes aegypti*: surveillance, resistance monitoring, and control alternatives in Brazil. *Epidemiol. Serv. Saude* 16: 295-302.
- Campos, K.B., A.J. Martins, C.d.M. Rodovalho, D.F. Bellinato, L.d.S. Dias, M.d.L.d.G. Macoris, M.T.M. Andrighetti, J.B.P. Lima, and M.T. Obara. 2020. Assessment of the susceptibility status of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations to pyriproxyfen and malathion in a nationwide monitoring of insecticide resistance performed in Brazil from 2017 to 2018. *Parasites Vectors* 13: 1-18.
- Campos, K.B., A.A. Alomar, B.H. Eastmond, M.T. Obara, and B.W. Alto. 2022. Brazilian populations of *Aedes aegypti* resistant to pyriproxyfen exhibit lower susceptibility to infection with Zika virus. *Viruses* 14: 2198.
- Carvalho, B.L., R.N.L. Germano, K.M.L. Braga, E.R.F.d. Araújo, D.d.A. Rocha, and M.T. Obara. 2020. Susceptibility of *Aedes aegypti* populations to pyriproxyfen in the Federal District of Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 53. e20190489.
- Chediak, M., F.G. Pimenta Jr, G.E. Coelho, I.A. Braga, J.B.P. Lima, K.R.L. Cavalcante, L.C. de Sousa, M.A.V. de Melo-Santos, M.d.L.d.G. Macoris, and A.P.d. Araújo. 2016. Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 111: 311-321.
- Cunha, M.D.P., A.N. Duarte-Neto, S.Z. Pour, L.A. Hajjar, F.P. Frassetto, M. Dolhnikoff, P.H.D. N. Saldiva, and P.M.A. Zanotto. 2021. Systemic dengue infection associated with a new dengue virus type 2 introduction in Brazil - a case report. *BMC Infect. Dis.* 21: 311.
- Dick, O.B., J.L. San Martín, R.H. Montoya, J. del Diego, B. Zambrano, and G.H. Dayan. 2012. The history of dengue outbreaks in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87: 584.
- Domingo, E., C. Escarmís, L. Menéndez-Arias, C. Perales, M. Herrera, I.S. Novella, and J.J. Holland. 2008. Viral quasispecies: dynamics, interactions, and pathogenesis. In: E. Domingo, C.R. Parrish, and J.J. Holland (eds). *Origin and Evolution of Viruses*. pp. 87-118. Academic Press, San Diego.
- Excler, J.L., M. Saville, S. Berkley, and J.H. Kim. 2021. Vaccine development for emerging infectious diseases. *Nat. Med.* 27: 591-600.
- Honório, N. 2017. Proposta metodológica de estratificação de áreas de risco para dengue, Chikungunya e Zika, 2017. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz.
- Kuno, G. 2014. Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. *J. Med. Entomol.* 47: 957-971.
- Lau, K.W., C.D. Chen, H.L. Lee, Y. Norma-Rashid, and M. Sofian-Azirun. 2015. Evaluation of insect growth

- regulators against field-collected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Malaysia. *J. Med. Entomol.* 52: 199-206.
- Lima, J.B., M.P. Da-Cunha, R.C. d. Silva, A.K. Galardo, S. Soares, I.A. Braga, R.P. Ramos, and D. Valle. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68(3): 329–333.
- Liu, N. 2015. Insecticide resistance in mosquitoes: Impact, mechanisms, and research directions. *Annu. Rev. Entomol.* 2015. 60: 537–559.
- Maciel-de-Freitas, R., F.C. Avendanho, R. Santos, G. Sylvestre, S.C. Araújo, J.B.P. Lima, A.J. Martins, G.E. Coelho, and D. Valle. 2014. Undesirable consequences of insecticide resistance following *Aedes aegypti* control activities due to a dengue outbreak. *PloS one* 9: e92424.
- Macoris, M.d.L., M.T.M. Andrighetti, D.M. V. Wanderley, and P.E.M. Ribolla. 2014. Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the State of São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47: 5.
- Macoris, M.d.L., A.J. Martins, M.T.M. Andrighetti, J.B.P. Lima, and D. Valle. 2018. Pyrethroid resistance persists after ten years without usage against *Aedes aegypti* in governmental campaigns: Lessons from São Paulo State, Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12: e0006390.
- Maoz, D., T. Ward, M. Samuel, P. Müller, S. Runge-Ranzinger, J. Toledo, R. Boyce, R. Velayudhan, and O. Horstick. 2017. Community effectiveness of pyriproxyfen as a dengue vector control method: A systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11: e0005651.
- Marcombe, S., F. Darriet, P. Agnew, M. Etienne, M.-M. Yp-Tcha, A. Yébakima, and V. Corbel. 2011. Field efficacy of new larvicide products for control of multi-resistant *Aedes aegypti* populations in Martinique (French West Indies). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84: 118.
- Moreira, I.M. 2018. Avaliação da suscetibilidade de populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) do Distrito Federal à inseticidas e seu controle de qualidade químico. Universidade de Brasília.
- Moyes, C.L., J. Vontas, A.J. Martins, L.C. Ng, S.Y. Koou, I. Dusfour, K. Raghavendra, J. Pinto, V. Corbel, and J.-P. David. 2017. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11: e0005625.
- PAHO. Pan American Health Organization. 2022. PLISA Health Information Platform for the Americas. (<https://www3.paho.org/data/index.php/en/>).
- Parra-Henao, G., G. Coelho, J.P. Escobar, G. Gonzalez, and H. Bezerra. 2021. Beyond traditional vector control and the need for strengthening integrated vector management in Latin America. *Ther. Adv. Infect. Dis.* 8: 2049936121997655.
- Rahman, R.U., B. Souza, I. Uddin, L. Carrara, L.P. Brito, M.M. Costa, M.A. Mahmood, S. Khan, J.B.P. Lima, and A.J. Martins. 2021. Insecticide resistance and underlying targets-site and metabolic mechanisms in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Lahore, Pakistan. *Sci. Rep.* 11: 1-15.
- Rasmussen, S.A., D.J. Jamieson, M.A. Honein, and L.R. Petersen. 2016. Zika virus and birth defects—reviewing the evidence for causality. *N. Engl. J. Med.* 374: 1981-1987.
- Ribeiro, G.d.O., D.E. Gill, E.S. D. Ribeiro, F.J. C. Monteiro, V.S. Morais, R. Marcatti, M.O. d.S. Rego, E.L.L. Araújo, S.S. Witkin, F. Villanova, et al. 2021. Adaptive evolution of new variants of dengue virus serotype 1 genotype V circulating in the Brazilian Amazon. *Viruses* 13: 689.
- Richards, S.L., B.D. Byrd, M.H. Reiskind, and A.V. White. 2020. Assessing insecticide resistance in adult mosquitoes: perspectives on current methods. *Environ. Hlth. Insights* 14: 1178630220952790.
- Roiz, D., A. Wilson, T. Scott, D. Fonseca, F. Jourdain, P. Müller, R. Velayudhan, and V. Corbel. 2018. Integrated *Aedes* management for the control of *Aedes*-borne diseases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12: e0006845.
- Roush, R.T. 1989. Designing resistance management programs: how can you choose? *Pestic. Sci.* 26: 423-441.
- Siqueira, A.S.P., H.L. F. Praça, J.P.C.d. Santos, H.G. Albuquerque, L.V. Pereira, T.C. Simões, E.V.V. Gusmão, A.A. T. Pereira, F.G. Pimenta Júnior, and A.A. Nobre. 2022. ArboAlvo: método de estratificação da receptividade territorial às arboviroses urbanas. *Rev. Saude Publica* 56.
- Su, T., J. Thieme, T. Lura, M.-L. Cheng, and M.Q. Brown. 2019. Susceptibility profile of *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae) from Montclair, California, to commonly used pesticides, with note on resistance to pyriproxyfen. *J. Med. Entomol.* 56: 1047-1054.
- Valle, D., D.F. Bellinato, P.F. Viana-Medeiros, J.B.P. Lima, and A.J.M. Junior. 2019. Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 114:e180544.



Article

# Brazilian Populations of *Aedes aegypti* Resistant to Pyriproxyfen Exhibit Lower Susceptibility to Infection with Zika Virus

Kauara Brito Campos<sup>1,2,3</sup> , Abdullah A. Alomar<sup>1</sup> , Bradley H. Eastmond<sup>1</sup>, Marcos Takashi Obara<sup>2</sup> and Barry W. Alto<sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Entomology and Nematology Department, Florida Medical Entomology Laboratory, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 200 9th SE, Vero Beach, FL 32962, USA
- <sup>2</sup> Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília 70910-900, Brazil
- <sup>3</sup> Coordenação Geral de Vigilância de Abovíroses, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Edifício PO 700, SRIV 702, Via W 5 Norte, Brasília 70723-040, Brazil
- \* Correspondence: bwalto@ufl.edu

**Abstract:** Zika virus (ZIKV) infection has caused devastating consequences in Brazil as infections were associated with neurological complications in neonates. *Aedes aegypti* is the primary vector of ZIKV, and the evolution of insecticide resistance (IR) in this species can compromise control efforts. Although relative levels of phenotypic IR in mosquitoes can change considerably over time, its influence on vector competence for arboviruses is unclear. Pyriproxyfen (PPF)-resistant populations of *Ae. aegypti* were collected from five municipalities located in Northeast of Brazil, which demonstrated different resistance levels; low (Serrinha, Brumado), moderate (Juazeiro do Norte, Itabuna), and high (Quixadá). Experimental per os infection using ZIKV were performed with individuals from these populations and with an insecticide susceptible strain (Rockefeller) to determine their relative vector competence for ZIKV. Although all populations were competent to transmit ZIKV, mosquitoes derived from populations with moderate to high levels of IR exhibited similar or lower susceptibility to ZIKV infection than those from populations with low IR or the susceptible strain. These observations suggest an association between IR and arbovirus infection, which may be attributable to genetic hitchhiking. The use of PPF to control Brazilian *Ae. aegypti* may be associated with an indirect benefit of reduced susceptibility to infection, but no changes in disseminated infection and transmission of ZIKV among PPF-resistant phenotypes.

**Keywords:** Zika virus; *Aedes aegypti*; pyriproxyfen; per os infection; insecticide resistance; viral titer; vector competence



**Citation:** Campos, K.B.; Alomar, A.A.; Eastmond, B.H.; Obara, M.T.; Alto, B.W. Brazilian Populations of *Aedes aegypti* Resistant to Pyriproxyfen Exhibit Lower Susceptibility to Infection with Zika Virus. *Viruses* **2022**, *14*, 2198. <https://doi.org/10.3390/v14102198>

Academic Editors: Joan L. Kenney and Yan-Jang Huang

Received: 19 August 2022  
Accepted: 28 September 2022  
Published: 6 October 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Zika virus (ZIKV) is an arthropod-borne virus (arbovirus) belonging to the family *Flaviviridae* and genus *Flavivirus*. It was first isolated from a rhesus sentinel monkey caged in the Zika forest of Uganda in 1947 and then from *Aedes (Stegomyia) africanus* mosquitoes in the same forest in 1948 [1]. Human infection was reported in Nigeria in 1953 [2]. In the following years, evidence of antibodies to ZIKV were found in human populations throughout Sub-Saharan Africa and Southeast Asia, despite the occurrence of a few symptomatic cases [3]. Zika virus is primarily transmitted by mosquito vectors, mainly attributed to the subgenus *Stegomyia* of the genus *Aedes* [3], where *Ae. aegypti* is considered as the primary ZIKV vector to humans [4]. There is evidence showing that ZIKV can be spread to humans by different means of transmission, including breastfeeding [5], sexual [6], and blood transfusion [3], which may complicate the control of this virus. Infections of ZIKV in humans are often asymptomatic; when present, symptoms include

mild fever, maculopapular rash, myalgia, arthralgia, retro-orbital pain, conjunctivitis, and headache [7].

Zika virus was not considered as a public health problem for decades due to few human clinical cases [8]. However, the first outbreak of ZIKV occurred in 2007 on Yap Island, Micronesia, caused by the Asian ZIKV lineage. Approximately, 73% of island residents were infected and reported mild and short-lived symptoms [8]. From 2013 to 2014, French Polynesia experienced an outbreak of ZIKV with high attack rates and cases associated with neurological complications (Guillain-Barré syndrome) [9]. The virus spread throughout the South Pacific in 2014, provoking outbreaks in New Caledonia, the Cook Islands, and Easter Island [10]. In November 2014, states in Brazil's Northeast region reported outbreaks of ZIKV infection [11], which were laboratory confirmed the following year [12]. The French Polynesian ZIKV strain, the Asian lineage of the virus, was speculated to have entered Brazil between May and December 2013 during specific sporting events [13]. In 2015, it has been estimated that there were between 440,000 and 1,300,000 cases of ZIKV in Brazil. [14]. The association between ZIKV infection and neurological signs/symptoms in adults has been confirmed [15], followed by confirmation of the association between ZIKV infection and neonatal microcephaly after the virus isolation from amniotic fluid and fetal brain tissue [16]. Retrospective analyses suggested that births of babies with microcephaly were associated with ZIKV infection and also occurred during the outbreak in French Polynesia, in 2013 and 2014 [17]. Later, autochthonous transmission of ZIKV has spread to all Brazilian states [18], the South and Central Americas, and the Caribbean [19].

Pyriproxyfen (PPF) is an insect growth regulator that targets mosquito immature stages, disrupts their development, and inhibits their emergence to adulthood [20–22]. Pyriproxyfen has been used to control *Ae. aegypti* in public health throughout Brazil since 2014, largely attributable to insecticide resistance (IR) in *Ae. aegypti* to other insecticides, including pyrethroids and organophosphates [23,24]. The most studied mechanisms responsible for the evolution of resistance are increased activity of detoxifying enzymes and modification of the insecticide target site. The resistance may have a cost on insects' biology as it can affect their life history traits, such as larval development, sexual competition, susceptibility to predation, and vector competence [25–29]. Assessment of the susceptibility status of 123 *Ae. aegypti* populations collected throughout Brazil between 2017 and 2018 detected IR to PPF in populations from municipalities in the states of Bahia and Ceará, Northeast region, for the first time in Brazil [24]. It is known that IR can affect vector control efforts and epidemic prevention; however, few studies have assessed the influence of IR on *Ae. aegypti* vector competence for arboviruses. To our knowledge, no study has been published evaluating the association between PPF resistance and vector competence of arboviruses. New collections of *Ae. aegypti* populations were carried out about 2 to 3 years later from previous municipalities (Serrinha, Brumado, Juazeiro do Norte, Itabuna, Quixadá) to investigate additional changes in resistance levels following continued PPF pressure. Here, we test the hypothesis that vector competence in Brazilian populations of *Ae. aegypti* varies with PPF resistance level.

## 2. Materials and Methods

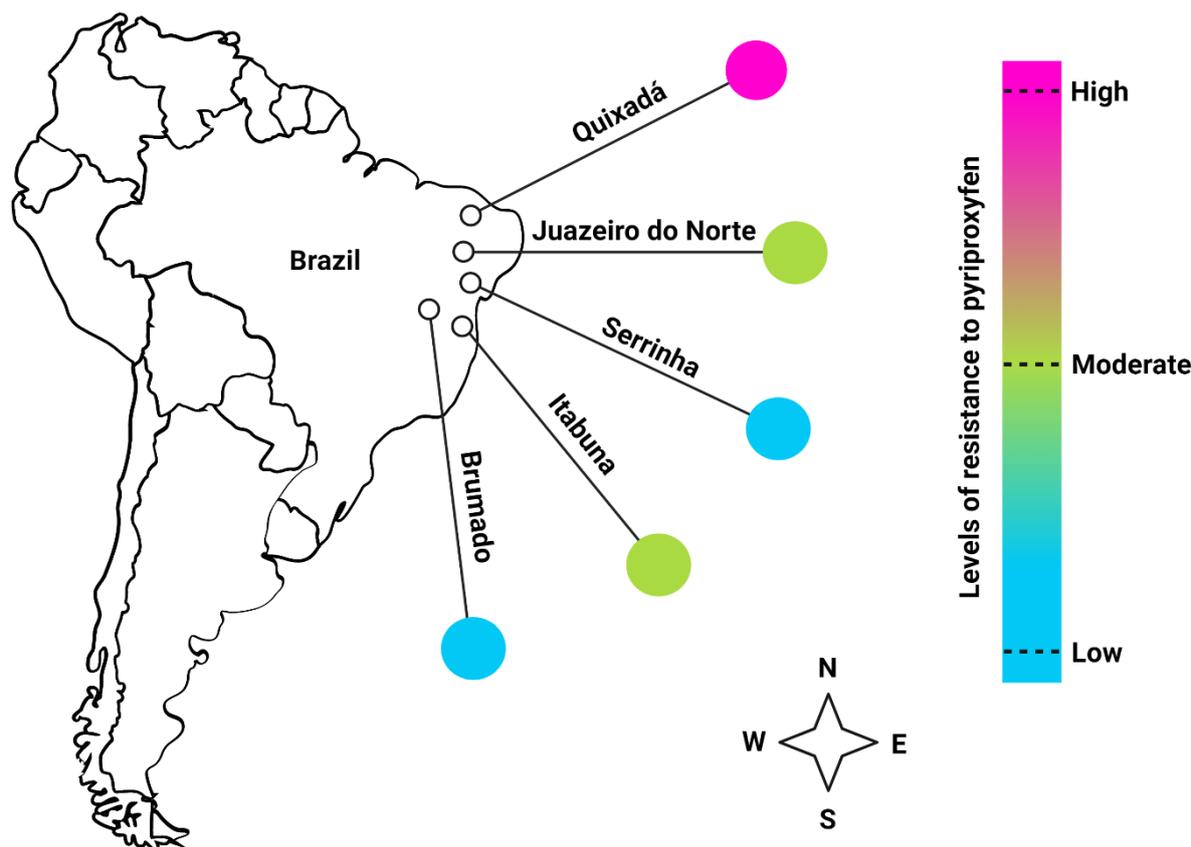
### 2.1. Ethics Statement

Mosquito infection experiments with ZIKV were performed in an arbovirology research facility (Biosafety level-2 and Arthropod Containment Level-2) at the Florida Medical Entomology Laboratory in accordance with the approved protocol by the University of Florida's Institutional Biosafety Committee and Animal Care and Use Committee.

### 2.2. Mosquito Populations

*Aedes aegypti* mosquito populations were collected in February and March 2020 from different cities (Serrinha, Brumado, and Itabuna, from Bahia state; Juazeiro do Norte, and Quixadá, from Ceará state) located in Northeast Brazil (Figure 1) using 100 ovitraps in towns with up to 50,000 houses and 150 ovitraps in cities with up to 200,000 homes,

following the MoReNAa Network methodology [30,31]. These ovitraps containing tap water, yeast extract solution (0.04%), and a single wooden paddle were distributed on the grounds of selected houses in a grid pattern for 15 days, covering the urban territory to include regions presenting different infestations levels. Field-collected parental generation eggs were hatched and used to establish laboratory colonies of each population, which were maintained at the Laboratory of Physiology and Control of Arthropod Vector (Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, LAFICAVE), at the Oswaldo Cruz Institute (IOC/Fiocruz), Rio de Janeiro/RJ before being shipped to Florida Medical Entomology Laboratory, Vero Beach.



**Figure 1.** Brazil map showing cities where *Ae. aegypti* mosquito populations were collected with their relative resistance levels to PPF.

Mosquitoes were maintained in an insectary at 26–28 °C, relative humidity of 70–80%, and a 12:12 h light–dark cycle. Larvae were hatched in deoxygenated water prepared in an insulated vacuum container powered by an electronic pump for 45 min, and newly hatched larvae were reared in pans of distilled water (1.5 L) and fed with fish food (TetraMin). Pupae were transferred to adult rearing cages, where emergent adults were maintained on a diet of 10% sucrose solution. To generate eggs, adult females were blood-fed on restrained chickens (*Gallus gallus domesticus*) according to animal use and care policies of the University of Florida’s Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC Protocol 202007682). Newly laid eggs were collected, kept moist for at least 24 h, and air-dried prior to storage at room temperature in plastic containers. Larval bioassays were conducted in all mosquito populations and in a Rockefeller susceptible stain (reference) to determine their resistance levels to PPF, following procedures described in the WHO guidelines for larvicidal bioassays. Modifications to the guidelines, such as changes in the number of exposed larvae, number of replicates, and amount of food offered to the larvae, were performed [32]. The results of bioassays revealed that low resistance rates in Serrinha and Brumado populations, moderate resistance in Juazeiro do Norte and Itabuna population,

and high resistance in Quixadá population. The full reports of IR of these populations to PPF are submitted for publication elsewhere.

### 2.3. Zika Virus and Cells

An isolate of ZIKV (Puerto Rico strain, PRVABC59) of the Asian lineage used in this study was collected from serum of a ZIKV-infected human who traveled to Puerto Rico in 2015 and provided to us by the U.S. Centers for Disease Control and Prevention. We passaged ZIKV three times in cell culture before use in the infection study involving *Ae. aegypti* populations from Brazil. The complete genome sequence of this virus strain can be found under Gene bank accession # KU501215.1. The propagation of ZIKV was performed as previously described [33]. Briefly, African green monkey (Vero) cells were allowed to grow in T-175 cm<sup>2</sup> cell culture flasks at 37 °C and 5% carbon dioxide atmosphere until 80–90% confluency. Cell monolayers were then infected with stock ZIKV at a 0.01 multiplicity of infection and incubated for six days at 37 °C in media (M199) (HyClone, Medium 199, GE Healthcare, Logan, UT, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), antibiotics (penicillin–streptomycin), and Mycostatin. After this incubation period, infectious cell culture supernatant was harvested and added to defibrinated bovine blood (Hemostat Laboratories, Dixon, CA, USA) with adenosine-5'-triphosphate disodium salt trihydrate (ATP, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) to obtain infectious bloodmeal [34,35].

### 2.4. Zika Virus-Infected Blood and per os Infection

Female mosquitoes aged 5–8 days old were kept in plastic cups and deprived of sucrose solution 24 h before per os infection challenges on viremic bloodmeals administered via Hemotek feeders (Discovery Workshops, Lancashire, UK) covered with sheep intestine as a membrane and heated to 37 °C. Mosquitoes were allowed to feed for 45 min at 28 °C. Immediately after feeding, infectious bloodmeals were aliquoted into cryovials from Hemotek feeders and frozen at –80 °C for later assays to determine viral titers fed by mosquitoes. Fully engorged females were separated from partial and unfed individuals using anesthetization with carbon dioxide and transferred to new plastic cups with access to 10% sucrose solution for the duration of the experiment. The vector competence study was performed with three biological replicates.

### 2.5. Cationic-(Q)-Paper and Saliva Collection

To examine viral transmission efficiency, the saliva of females was collected using the cationic-(Q)-paper (CQP) method as described elsewhere [33]. Briefly, after an incubation period of 14 days post-infection (dpi), mosquitoes were transferred individually to *Drosophila* cultivation vials (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) containing wet CQPs treated with honey that were placed on the mesh at the top of the cultivation vials to collect their saliva upon feeding on honey-containing CQPs. In order to determine whether a female fed on honey and deposited saliva, blue food coloring was mixed with honey and used as a visual marker. Mosquitoes were kept in the cultivation vials and allowed to feed on the honey-containing CQPs for 24 h. Following feeding, females were anesthetized with carbon dioxide and dissected to separate their bodies from legs, and each mosquito sample (body, leg, CQP) was stored separately in microcentrifuge tubes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) containing M199 and frozen at –80 °C until further processing. Saliva was assayed for the presence of ZIKV from females that were successfully fed on honey-containing CQPs as indicated by visualization of blue coloring in their crops.

### 2.6. Ribonucleic Acid Extraction and Real-Time PCR for Zika Virus Quantification

Viral RNA was extracted from the frozen mosquito bodies, legs, and CQPs using QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA), following homogenization of samples with steel BBs in a TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) at 19.5 Hz for 3 min and centrifuged at 13,200 rpm for 5 min. Zika virus RNA was detected and quantified by quantitative CFX96

real-time PCR system (qRT-PCR) (BioRad Laboratories, Hercules, CA). The primer sequences used were F: 5'-CTTCTTATCCACAGCCGTCTC-3' and R: 5'-CCAGGCTTCAACGTCGTTAT-3', with probe sequence: 5'-/56 FAM/AGAAGGAGACGAGATGCGGTACAGG/3BHQ\_1/-3'. Reactions were performed using SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq Polymerase (Invitrogen). The conditions of the qRT-PCR were 94 °C for 2 min, and 39 cycles of 94 °C for 15 s, 50 °C for 30 min, and 58 °C for 1 min. Titers of virus in mosquito tissues and saliva were quantified using a standard curve that compares cDNA synthesis to a range of ZIKV serial dilutions in parallel with plaque assays of the same dilutions of the virus, expressed as plaque forming unit equivalents (PFUe)/mL.

### 2.7. Statistical Analysis

Susceptibility to infection (number of positive bodies/total number of mosquitoes tested), disseminated infection (number of infected legs/total number of infected bodies), and saliva infection (number of positive saliva/total number of infected legs) were calculated for each population and analyzed using logistic regression analysis (PROC LOGISTIC, SAS 9.4). Significant treatment effects were further examined using pairwise comparisons of treatment groups as follow-up tests, correcting for multiple comparisons by the Tukey–Kramer method. Viral titers in mosquito samples were tested for differences among mosquito populations using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's range test for multiple comparisons. *p*-values lower than 0.05 were considered statistically significant.

## 3. Results

To determine mosquito susceptibility to infection with ZIKV, a total of 276 females from all resistant populations that imbibed the infectious blood meal containing viral titer of 6.35 log<sub>10</sub> PFUe/mL and survived the 14 days incubation period were tested for the presence of ZIKV in their bodies following viral RNA extraction. The viral titer of infectious bloodmeals approximated the viremic titers observed in humans [36].

Logistic regression analysis showed a highly significant effect of PPF resistance on mosquito susceptibility to ZIKV infection ( $\chi^2 = 41.50$ , *df* = 5, *p* < 0.0001). Susceptibility to infection varied among the five mosquito populations, where low resistant populations exhibited higher infection rates than moderate or high resistant populations (Table 1). Thus, the Brazilian populations of *Ae. aegypti* resistant to PPF exhibit similar or lower susceptibility to infection with ZIKV than individuals from weakly resistant and susceptible populations of *Ae. aegypti*.

**Table 1.** Logistic regression of resistant mosquito populations on susceptibility to infection (body). Results show the means (probability scale), standard errors, and 95% confidence intervals (lower and upper means) for susceptibility to Zika infection. Means followed by different letters denote significant differences.

Population (Resistance Level)	Mean (No. Samples)	Std. Error of Mean	Lower Mean	Upper Mean
Rockefeller (reference strain)	0.8491 (51) a	0.04917	0.7262	0.9227
Serrinha (Low)	0.9512 (39) a	0.03364	0.8248	0.9878
Brumado (Low)	0.8600 (48) a	0.04907	0.7343	0.9318
Juazeiro do Norte (Moderate)	0.8200 (48) a	0.05433	0.6889	0.9036
Itabuna (Moderate)	0.4694 (47) b	0.07129	0.3354	0.6079
Quixadá (High)	0.5111 (43) b	0.07452	0.3682	0.6523

No significant effects of PPF resistance were observed on disseminated infection of ZIKV into leg tissue ( $\chi^2 = 3.37$ , *df* = 5, *p* = 0.64), or transmission by infected saliva ( $\chi^2 = 8.25$ , *df* = 5, *p* = 0.14, Tables 2 and 3).

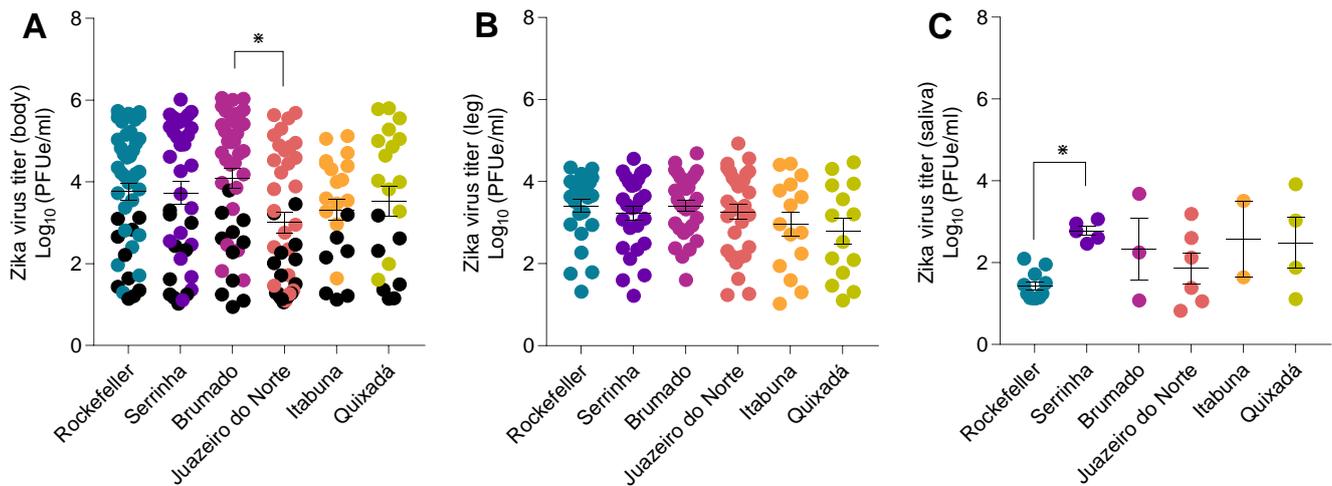
**Table 2.** Logistic regression of resistant mosquito populations on susceptibility to disseminated infection (legs). Results show the means (probability scale), standard errors, and 95% confidence intervals (lower and upper means) for disseminated Zika infection. Means followed by different letters denote significant differences.

Population (Resistance Level)	Mean (No. Samples)	Std. Error of Mean	Lower Mean	Upper Mean
Rockefeller (reference strain)	0.5869 (44) a	0.07260	0.4414	0.7187
Serrinha (Low)	0.6750 (38) a	0.07406	0.5173	0.8010
Brumado (Low)	0.7273 (42) a	0.06714	0.5787	0.8381
Juazeiro do Norte (Moderate)	0.7561 (40) a	0.06707	0.6031	0.8634
Itabuna (Moderate)	0.6667 (22) a	0.09623	0.4612	0.8237
Quixadá (High)	0.6667 (22) a	0.09623	0.4612	0.8237

**Table 3.** Logistic regression of resistant mosquito populations on susceptibility to transmission (saliva). Results show the means (probability scale), standard errors, and 95% confidence intervals (lower and upper means) for Zika infection of saliva. Means followed by different letters denote significant differences.

Population (Resistance Level)	Mean (No. Samples)	Std. Error of Mean	Lower Mean	Upper Mean
Rockefeller (reference strain)	0.4286 (26) a	0.09352	0.2619	0.6132
Serrinha (Low)	0.2143 (26) a	0.07754	0.09957	0.4021
Brumado (Low)	0.1212 (31) a	0.05682	0.04625	0.2818
Juazeiro do Norte (Moderate)	0.2188 (31) a	0.07308	0.1080	0.3930
Itabuna (Moderate)	0.1765 (15) a	0.09246	0.05801	0.4271
Quixadá (High)	0.2941 (15) a	0.1105	0.1280	0.5419

Analysis of variance showed that PPF resistance had a significant effect on ZIKV titers in bodies ( $F = 2.33$ ,  $df = 5$ ,  $p = 0.04$ ) and saliva ( $F = 2.74$ ,  $df = 5$ ,  $p = 0.04$ ), but not in legs ( $F = 1.31$ ,  $df = 5$ ,  $p = 0.26$ ). Although ZIKV prevalence of infection was highly variable between populations, only difference in viral titer was observed between the low resistant (Brumado) and moderate resistant (Juazeiro do Norte) populations (Figure 2A). Similar means of ZIKV titers were detected in legs of mosquitoes from different populations (Figure 2B). However, low resistant population (Serrinha) exhibited higher viral titers in comparison to the insecticide susceptible strain (Rockefeller) (Figure 2C).



**Figure 2.** Titers of ZIKV in bodies (A), legs (B) and saliva (C) at 14 dpi for individuals derived from five Brazilian populations of *Ae. aegypti* with different levels of PPF resistance and an insecticide susceptible strain of *Ae. aegypti* (Rockefeller). Bars represent means  $\pm$  standard error of the means. Black and color circles in (A) represent viral titers for mosquitoes with non-disseminated infections (i.e., ZIKV infection limited to midgut) and disseminated infections (ZIKV infection spread to the hemocoel), respectively. Asterisk symbols above the graphs denote significant differences following comparisons of viral titers between infected groups.

#### 4. Discussion

The Northeast region of Brazil was the first and most severely affected by the ZIKV epidemic in 2014 and 2015 [11,15]. Three years later, *Ae. aegypti* populations resistant to the larvicide PPF were detected in some cities in the same region [24], which is predicted to undermine the control of mosquito-borne arboviruses. However, some authors have suggested that IR may also impinge on mosquito control through alterations in vector traits, especially vector longevity, competence, and behavior [37]. We investigated the relationship between PPF resistance and susceptibility to ZIKV infection and transmission in *Ae. aegypti* populations collected from five cities in the Northeast region of Brazil, which demonstrated different levels of resistance to PPF: low (Serrinha, Brumado), moderate (Juazeiro do Norte, Itabuna), and high (Quixadá).

Previous studies have examined the impacts of exposure to PPF on mosquito vector competence for arboviruses [20,33]. For instance, exposing mosquitoes to PPF altered their susceptibility to ZIKV, specifically, individuals exposed to PPF at larval stages exhibit enhancement of ZIKV infection and transmission in *Ae. aegypti* [33]. The authors suggested that alteration in vector competence for ZIKV in mosquitoes surviving PPF exposure during immature stages may be associated with variation in adult size and other physiological changes (e.g., stress-induced changes) that may modify their responses to virus infection [33]. The previous studies occurred during a single generation. In contrast, assessments of the influence of IR on vector competence of arboviruses occurs over multiple generations, allowing for the possibility of the evolution of IR. Thus, differences in vector competencies may not be expected to share similar directional effects or mechanisms. To our knowledge, our study is one of the first studies to examine the influence of different levels of PPF resistance on mosquito responses to arbovirus infection. We showed that populations from Itabuna and Quixadá which exhibit moderate to high resistance levels to PPF, respectively, had lower susceptibility to ZIKV infection than other populations, including the insecticide susceptible strain (Rockefeller). Our results showed a potential association between IR and arbovirus infection, which may be attributable to genetic hitchhiking. Chromosomal linkage can allow for the possibility that dynamics of a selected site affect the genetic variation at nearby neutral loci, termed “genetic hitchhiking” [38]. Studies with *Drosophila* and *Ae. aegypti* show that genetic variation of selectively neutral

loci in a genome can be constrained by fixation of advantageous mutations associated with hitchhiking effect [39]. That is, variation of selectively neutral loci may be constrained by a genetic hitchhiking effect in genome regions under extensive selection, as can be the case in which mosquitoes are frequently being exposed to insecticides [39,40]. For example, genes closely linked to the organophosphate insecticide target loci are predicted to exhibit reduced genetic variation because of a genetic hitchhiking effect associated with intensive organophosphate insecticide selection [39]. Similar concepts have been investigated and suggested for the impact of insecticide resistance on *Culex pipiens* immunity [41].

The mechanisms of PPF resistance in mosquitoes are not yet fully understood. The involvement of overexpression of P450 and GST detoxification enzyme activities was suggested [42]. Significant increases in detoxification enzyme activities were also reported in *Ae. albopictus* resistant to PPF, corroborating the hypothesis that such resistance has a metabolic basis [43]. In agreement with our findings, [44] evaluated the susceptibility of mosquitoes with different pyrethroid resistance profiles to infection and transmission of dengue viruses (DENVs), and the authors found a negative association between the frequency of *kdr* mutations (related to pyrethroid knockdown resistance) and vector competence for DENV in *Ae. aegypti*. Specifically, mosquitoes with the highest frequency of mutant alleles L1016 and C1534 had lower infection and transmission rates than those presenting low or no frequency of *kdr* mutant alleles [44]. Furthermore, [45] reported lower rate of adult lifespan in deltamethrin-resistant *Ae. albopictus* in comparison to the susceptible line, and when these two lines were orally challenged with DENV-2, individuals' resistant to deltamethrin showed a reduction in infection rates and viral titers of DENV-2 in the head, salivary glands, and ovaries at 14 dpi. The authors also found lower horizontal transmission to mice and vertical transmission to their progeny in those resistant mosquitoes [45]. The highest deltamethrin resistance level was associated with the lowest dissemination rates of chikungunya virus in *Ae. aegypti* [46]. Together, these observations along with our study suggest that mosquitoes exhibiting resistance to insecticides may experience fitness costs and lower susceptibility to infection with arboviruses.

On the other hand, other studies observed a positive association between IR and vector competence for arboviruses. A study by [47] determined the influence of IR on lines of organophosphate-resistant *Cx. quinquefasciatus*, where these lines demonstrated higher vector competence than insecticide-susceptible reference line for West Nile virus. Higher infection rates of ZIKV were observed in a pyrethroid-resistant population of *Ae. aegypti* [48]. Permethrin-selected *Ae. aegypti* mosquitoes demonstrated significant increase in dissemination rates of DENV-1 [49]. Although the reasons responsible for these variations between IR and vector competence studies are not known, they may be attributable to different mechanisms involved in IR, genetic backgrounds between mosquito populations, and virus strains.

In conclusion, our data revealed that Brazilian *Ae. aegypti* populations with different PPF resistance profiles show altered susceptibility to ZIKV infections, specifically lower infection rates among populations of Itabuna and Quixadá which exhibited moderate and high resistance to PPF, respectively. Although our study suggested an indirect benefit of reduced infection rates of ZIKV in some PPF-resistant mosquito populations, it is essential to continue applying IR mitigation strategies considering that all populations were able to transmit ZIKV and given that previous reports detecting increases in vector competence of resistant mosquitoes for some arboviruses. Further studies are needed to better understand the relationship between IR and mosquito responses to arbovirus infection and transmission.

**Author Contributions:** Conceptualization, K.B.C. and B.W.A.; Methodology, K.B.C. and B.W.A.; Conducted experiments, K.B.C. and B.H.E.; Data Curation, K.B.C. and B.H.E.; Formal Analysis, A.A.A. and B.W.A.; Data Visualization, A.A.A.; Writing—Original Draft Preparation, K.B.C.; Writing—Review and Editing, A.A.A., M.T.O. and B.W.A.; Supervision, B.W.A.; Resources, B.W.A.; Project Administration, B.W.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the Institutional Review Committee of the University of Florida (IACUC #202007682).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** The authors wish to thank the municipal teams involved in the bioassay sample collections, the coordination state teams, and the LAFICAVE/FIOCRUZ team that assisted with mosquito rearing. An isolate of Zika virus was kindly provided by the U.S. Centers for Disease Control and Prevention. Figure 1 was created with biorender.com.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Dick, G.W.A.; Kitchen, S.F.; Haddock, A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1952**, *46*, 509–520. [[CrossRef](#)]
2. Macnamara, F.N. Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1954**, *48*, 139–145. [[CrossRef](#)]
3. Slavov, S.N.; Otaguiri, K.K.; Kashima, S.; Covas, D.T. Overview of Zika virus (ZIKV) infection in regards to the Brazilian epidemic. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2016**, *49*, e5420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Marchette, N.J.; Garcia, R.; Rudnick, A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1969**, *18*, 411–415. [[CrossRef](#)]
5. Besnard, M.; Lastere, S.; Teissier, A.; Cao-Lormeau, V.; Musso, D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill.* **2014**, *19*, 20751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Moreira, J.; Peixoto, T.M.; Siqueira, A.M.; Lamas, C.C. Sexually acquired Zika virus: A systematic review. *Clin Microbiol. Infect.* **2017**, *23*, 296–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Marano, G.; Pupella, S.; Vaglio, S.; Liembruno, G.M.; Grazzini, G. Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and transfusion medicine. *Blood Transfus.* **2016**, *14*, 95–100. [[CrossRef](#)]
8. Lessler, J.; Chaisson, L.H.; Kucirka, L.M.; Bi, Q.; Grantz, K.; Salje, H.; Carcelen, A.C.; Ott, C.T.; Sheffield, J.S.; Ferguson, N.M.; et al. Assessing the global threat from Zika virus. *Science* **2016**, *353*, aaf8160. [[CrossRef](#)]
9. Cao-Lormeau, V.M.; Blake, A.; Mons, S.; Lastère, S.; Roche, C.; Vanhomwegen, J.; Dub, T.; Baudouin, L.; Teissier, A.; Larre, P.; et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *Lancet* **2016**, *387*, 1531–1539. [[CrossRef](#)]
10. Roth, A.; Mercier, A.; Lepers, C.; Hoy, D.; Duituturaga, S.; Benyon, E.; Guillaumot, L.; Souares, Y. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections—An unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Eur. Surveill.* **2014**, *19*, 20929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Campos, G.S.; Bandeira, A.C.; Sardi, S.I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 1885–1886. [[CrossRef](#)]
12. Zanoluca, C.; Melo, V.C.; Mosimann, A.L.; Santos, G.I.; Santos, C.N.; Luz, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2015**, *110*, 569–572. [[CrossRef](#)]
13. Faria, N.R.; Azevedo, R.D.S.D.S.; Kraemer, M.U.G.; Souza, R.; Cunha, M.S.; Hill, S.C.; Thézè, J.; Bonsall, M.B.; Bowden, T.A.; Rissanen, I.; et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* **2016**, *352*, 345–349. [[CrossRef](#)]
14. Heukelbach, J.; Alencar, C.H.; Kelvin, A.A.; de Oliveira, W.K.; de Góes Cavalcanti, L.P. Zika virus outbreak in Brazil. *J. Infect Dev. Ctries.* **2016**, *10*, 116–120. [[CrossRef](#)]
15. Brito, C. Zika virus: A new chapter in the history of medicine. *Acta Med. Port.* **2015**, *28*, 679–680. [[CrossRef](#)]
16. Rasmussen, S.A.; Jamieson, D.J.; Honein, M.A.; Petersen, L.R. Zika virus and birth defects—Reviewing the evidence for causality. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 1981–1987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Cauchemez, S.; Besnard, M.; Bompard, P.; Dub, T.; Guillemette-Artur, P.; Eyrolle-Guignot, D.; Salje, H.; Van Kerkhove, M.D.; Abadie, V.; Garel, C.; et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–2015: A retrospective study. *Lancet* **2016**, *387*, 2125–2132. [[CrossRef](#)]
18. Faria, N.R.; Quick, J.; Claro, I.M.; Thézè, J.; de Jesus, J.G.; Giovanetti, M.; Kraemer, M.U.G.; Hill, S.C.; Black, A.; da Costa, A.C.; et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature* **2017**, *546*, 406–410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Fauci, A.S.; Morens, D.M. Zika virus in the Americas—yet another arbovirus threat. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 601–604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Alomar, A.A.; Eastmond, B.H.; Alto, B.W. The effects of exposure to pyriproxyfen and predation on Zika virus infection and transmission in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0008846. [[CrossRef](#)]

21. Alomar, A.A.; Alto, B.W. Mosquito responses to lethal and nonlethal effects of predation and an insect growth regulator. *Ecosphere* **2021**, *12*, e03452. [CrossRef]
22. Alomar, A.A.; Alto, B.W. Evaluation of pyriproxyfen effects on *Aedes aegypti* and predatory mosquito *Toxorhynchites rutilus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **2022**, *59*, 585–590. [CrossRef]
23. Lima, E.P.; Paiva, M.H.S.; de Araújo, A.P.; da Silva, E.V.G.; da Silva, U.M.; de Oliveira, L.N.; Santana, A.E.G.; Barbosa, C.N.; de Paiva Neto, C.C.; Goulart, M.O.F.; et al. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites Vectors* **2011**, *4*, 5. [CrossRef]
24. Campos, K.B.; Martins, A.J.; Rodovalho, C.d.M.; Bellinato, D.F.; Dias, L.d.S.; Macoris, M.d.L.d.G.; Andrighetti, M.T.M.; Lima, J.B.P.; Obara, M.T. Assessment of the susceptibility status of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations to pyriproxyfen and malathion in a nation-wide monitoring of insecticide resistance performed in Brazil from 2017 to 2018. *Parasites Vectors* **2020**, *13*, 1–18. [CrossRef]
25. Paris, M.; David, J.-P.; Despres, L. Fitness costs of resistance to *Bti* toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Ecotoxicology* **2011**, *20*, 1184–1194. [CrossRef]
26. Martins, A.J.; Ribeiro, C.D.; Bellinato, D.F.; Peixoto, A.A.; Valle, D.; Lima, J.B. Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e31889. [CrossRef]
27. Belinato, T.A.; Martins, A.J.; Valle, D. Fitness evaluation of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2012**, *107*, 916–922. [CrossRef]
28. Diniz, D.F.A.; de Melo-Santos, M.A.; Santos, E.M.M.; Beserra, E.B.; Helvecio, E.; de Carvalho-Leandro, D.; de Santos, B.S.; Lima, V.L.d.M.; Ayres, C.F.J. Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. *Parasites Vectors* **2015**, *8*, 662. [CrossRef]
29. Ndiath, M.O. Insecticides and insecticide resistance. *Methods Mol. Biol.* **2019**, *2013*, 287–304. [CrossRef]
30. Lima, J.B.P.; Da-Cunha, M.P.; JÚNIOR, R.C.D.S.; Galardo, A.K.R.; Soares, S.S.; Braga, I.A.; Ramos, R.P.; Valle, D. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2003**, *68*, 329–333. [CrossRef]
31. Braga, I.A.; Valle, D. *Aedes aegypti*: Surveillance, resistance monitoring, and control alternatives in Brazil. *Epidemiol. Serv. Saude* **2007**, *16*, 295–302. [CrossRef]
32. WHO. World Health Organization. Entomological Surveillance for *Aedes* spp. in the Context of Zika Virus: Interim Guidance for Entomologists. Available online: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-ZIKV-VC-16.2> (accessed on 8 August 2022).
33. Alomar, A.A.; Eastmond, B.H.; Alto, B.W. Juvenile hormone analog enhances Zika virus infection in *Aedes aegypti*. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 21062. [CrossRef]
34. Alomar, A.A.; Alto, B.W. Temperature-mediated effects on Mayaro virus vector competency of Florida *Aedes aegypti* mosquito vectors. *Viruses* **2022**, *14*, 880. [CrossRef]
35. Alomar, A.A.; Eastmond, B.H.; Rapti, Z.; Walker, E.D.; Alto, B.W. Ingestion of spinosad-containing toxic sugar bait alters *Aedes albopictus* vector competence and vectorial capacity for dengue virus. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 933482. [CrossRef]
36. Lanteri, M.C.; Kleinman, S.H.; Glynn, S.A.; Musso, D.; Keith Hoots, W.; Custer, B.S.; Sabino, E.C.; Busch, M.P. Zika virus: A new threat to the safety of the blood supply with worldwide impact and implications. *Transfusion* **2016**, *56*, 1907–1914. [CrossRef]
37. Rivero, A.; Vézilier, J.; Weill, M.; Read, A.F.; Gandon, S. Insecticide control of vector-borne diseases: When is insecticide resistance a problem? *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1001000. [CrossRef]
38. Friedlander, E.; Steinrücken, M. A numerical framework for genetic hitchhiking in populations of variable size. *Genetics* **2022**, *220*, iyac012. [CrossRef]
39. Yan, G.; Chadee, D.D.; Severson, D.W. Evidence of genetic hitchhiking effect associated with insecticide resistance in *Aedes aegypti*. *Genetics* **1998**, *148*, 793–800. [CrossRef]
40. Maynard Smith, J.; Haigh, J. The hitch-hiking effect of a favorable gene. *Genet. Res.* **1974**, *23*, 23–35. [CrossRef]
41. Vézilier, J.; Nicot, A.; De Lorget, J.; Gandon, S.; Rivero, A. The impact of insecticide resistance on *Culex pipiens* immunity. *Evol. Appl.* **2012**, *6*, 497–509. [CrossRef]
42. Yunta, C.; Grisales, N.; Nász, S.; Hemmings, K.; Pignatelli, P.; Voice, M.; Ranson, H.; Paine, M.J.I. Pyriproxyfen is metabolized by P450s associated with pyrethroid resistance in *An. gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2016**, *78*, 50–57. [CrossRef]
43. Marcombe, S.; Farajollahi, A.; Healy, S.P.; Clark, G.G.; Fonseca, D.M. Insecticide resistance status of United States populations of *Aedes albopictus* and mechanisms involved. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e101992. [CrossRef]
44. Stephenson, C.J.; Coatsworth, H.; Waits, C.M.; Nazario-Maldonado, N.M.; Mathias, D.K.; Dinglasan, R.R.; Lednicky, J.A. Geographic partitioning of dengue virus transmission risk in Florida. *Viruses* **2021**, *13*, 2232. [CrossRef]
45. Deng, J.; Guo, Y.; Su, X.; Liu, S.; Yang, W.; Wu, Y.; Kun, W.; Guiyun, Y.; Xiao-Guang, C. Impact of deltamethrin-resistance in *Aedes albopictus* on its fitness cost and vector competence. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2021**, *15*, e0009391. [CrossRef]
46. Wang, L.; Fontaine, A.; Gaborit, P.; Guidez, A.; Issaly, J.; Girod, R.; Kazanji, M.; Rousset, D.; Vignuzzi, M.; Epelboin, Y.; et al. Interactions between vector competence to chikungunya virus and resistance to deltamethrin in *Aedes aegypti* laboratory lines? *Med. Vet. Entomol* **2022**, 1–10, (Online ahead of print). [CrossRef]
47. Atyame, C.M.; Alout, H.; Mousson, L.; Vazeille, M.; Diallo, M.; Weill, M.; Failloux, A.-B. Insecticide resistance genes affect *Culex quinquefasciatus* vector competence for West Nile virus. *Proc. R. Soc. B* **2019**, *286*, 20182273. [CrossRef]

- 
48. Parker-Crockett, C.; Connelly, C.R.; Siegfried, B.; Alto, B. Influence of pyrethroid resistance on vector competency for Zika virus by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **2021**, *58*, 1908–1916. [[CrossRef](#)]
  49. Chen, T.Y.; Smartt, C.T.; Shin, D. Permethrin resistance in *Aedes aegypti* affects aspects of vectorial capacity. *Insects* **2021**, *12*, 71. [[CrossRef](#)]