



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

MAYRA DE SOUSA FÉLIX DE LIMA

Coleiras caninas impregnadas com inseticida para o controle da Leishmaniose Visceral: avaliação da suscetibilidade de *Lutzomyia longipalpis* a deltametrina

BRASÍLIA

2024

Coleiras caninas impregnada com inseticida para o controle da Leishmaniose Visceral: avaliação da suscetibilidade de *Lutzomyia longipalpis* a deltametrina

MAYRA DE SOUSA FÉLIX DE LIMA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília para a obtenção do título de mestre em Medicina Tropical, na área de concentração: Biologia das doenças infecciosas e parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Takashi Obara

Brasília

2024

Coleiras caninas impregnada com inseticida para o controle da Leishmaniose Visceral: avaliação da suscetibilidade de *Lutzomyia longipalpis* a deltametrina

Universidade de Brasília

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcos Takashi Obara (Orientador)
Universidade de Brasília - UnB

Dra. Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa (Titular)
Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ – MG

Prof. Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves (Titular)
Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dra. Kauara Brito Campos (Suplente)
Ministério da Saúde

Brasília

2024

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

dD278c de Sousa Félix de Lima, Mayra
Coleiras caninas impregnadas com inseticida para o
controle da Leishmaniose Visceral: avaliação da
susceptibilidade de Lutzomyia longipalpis a deltametrina /
Mayra de Sousa Félix de Lima; orientador Marcos Takashi
Obara. -- Brasília, 2024.
139 p.

Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) --
Universidade de Brasília, 2024.

1. Lutzomyia longipalpis. 2. Leishmaniose Visceral. 3.
Resistência. I. Takashi Obara, Marcos, orient. II. Título.

A "Jesus Cristo" você me salvou de todas as formas que uma pessoa pode ser salva. Você foi a minha cura e segurou o meu coração quando não consegui suportar. Você acalmou o oceano dentro de mim. Me ensinou a me amar e a Te amar, e me mostrou como o amor pode salvar alguém. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, por colocar em meu caminho muitos desafios e oportunidades, alegrias e tristezas, por me guiar e iluminar minha mente para que eu pudesse trilhar meu caminho, por permitir que durante essa caminhada eu encontrasse tantas pessoas especiais.

A minha amada mãe, por me ensinar os caminhos a seguir, pelo apoio, dedicação, carinho e companheirismo, a senhora é minha maior inspiração, amo você!

Ao meu querido orientador Prof. Marcos Takashi Obara, pela confiança, paciência, pelos inúmeros ensinamentos, e por ser para mim um exemplo de profissional. Sou muito grata ao senhor, obrigada!

Minha família pelas palavras de amor e apoio. A minha avó Eulália por toda ajuda que me deu durante todos esses anos. A minha pequena e amada irmã Illys Maria (você é o grande amor da minha vida). Às minhas tias, em especial Senhora minha segunda mãe, Antonia e Frauza, por todo o amor, apoio, carinho e atenção desde minha infância e sempre que aqui precisei. Às minhas queridas primas/irmãs Luana, Laiane e Edinaria, pelo apoio constante, amizade, conselhos e por todos os momentos adoráveis que já compartilhamos.

Ao pessoal do Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da Faculdade de Medicina da UnB, em especial a técnica Patrícia, você é uma grande amiga.

A minhas amigas da Igreja Metodista da 406, Esmeralda, Patricia, Larissa, Carol, Janet e Renata, encontrar vocês foi um presente de Deus na minha vida.

Aos meus amigos e funcionários da Casa da Pós- graduação da UnB- Colina Bloco K. João Paulo, Dalila, Jackson, Felipe, Juliana e Mara. Aos funcionários, Edivan e Fabiana.

Aos meus colegas do Núcleo de Medicina Tropical, que de alguma forma contribuíram para minha formação, em especial para Jessica e Carla.

Aos meus amigos de vida que me incentivaram e me apoiam constantemente. Lais, Angela, Fabricio, Nivia, Vanessa, Gabriel, Bruno.

A secretária do Núcleo de Medicina Tropical, Lúcia Martins, por ser um ser iluminado e que está sempre disposta a ajudar.

A Coordenação-Geral de Vigilância de Zoonoses e Doenças de Transmissão Vetorial/DEDT/SVSA/MS pelo apoio financeiro para realização dos experimentos, especialmente Rafaella Albuquerque.

Ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZs) do município de Montes Claros/MG, especialmente seu Ronaldo Cardoso dos Santos, Douglas Aparecido de Oliveira e Warlen Ferreira Silva.

Ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZs) do município de Teresina/PI, especialmente Juvenal Ramos da Costa Filho, Jânio de Jesus Gonçalves Lima, Lurdes Martins de Sousa, Oriana Bezerra Lima, Washington Mendes de Oliveira, Francisco Michael Júnior Costa e Luana Oliveira de Lima.

A Secretaria Estadual de Saúde de Goiás, especialmente Carmesi Natalina Elias, José Maria Ferreira da Mata, Olindo Copel Hernandez e Belchior Alves Cirino.

A Secretaria Estadual de Saúde do Ceará, especialmente para os técnicos da Célula de Vigilância Entomologia e Controle de Vetores-CEVET. Helder Pereira da Costa, Luis Osvaldo Rodrigues da Silva, Gilvamar da Silva Almeida, Deoclésio Basilio da Silva, José Walden Costa Tavares, Nayara, Francisca Rosimeire Sabino Almorim e Luciano Gomes Chaves.

A Secretaria Estadual de Saúde do Paraná, especialmente Maiane Regina Ferreira Soares, Marília de Melo Santos de Castilho, Adão Celestino Ferreira e Edilson Semczuk.

A todos os moradores de todos os municípios que disponibilizaram suas residências para instalação das armadilhas.

A estudante de iniciação científica Gabriela de Oliveira Mosqueira, pela ajuda na montagem e identificação dos flebotomíneos.

Ao professor Andrey Andrade, pela ajuda na identificação dos flebotomíneos, por me receber em seu laboratório e me guiar/ensinar no processo taxonômico, obrigada!

Ao Prof. Rodrigo Gurgel, pelas palavras sobre perdão que me ajudaram a compreender e perdoar. Pelas contribuições para minha dissertação. Obrigada!

A Dra. Kauara Campos pelas contribuições ao trabalho e pelo aceite em participar da minha banca. Obrigada!

A Douglas de Almeida, por acompanhar-me no início do trabalho, obrigada pelas dicas e paciência.

Ao Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos-IOC/FIOCRUZ, pela disponibilidade do espaço e colônia de *Lu. longipalpis* para realização do bioensaio para determinação da Dose Diagnostica, especialmente a Bianca Carvalho.

A todos os professores que participaram da minha jornada acadêmica.

E, por fim, a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, serei eternamente grata.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida da <i>Leishmania infantum</i>	22
Figura 2. Principais manifestações clínicas da Leishmaniose Visceral	23
Figura 3. Cão com LVC, apresentando apatia, alopecia e lesões no corpo	24
Figura 4. Métodos de diagnóstico da LV	26
Figura 5. Mapas de distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral	29
Figura 6. Número de casos registrados de leishmaniose visceral, Região das Américas, 2001-2021	30
Figura 7. Casos de Leishmaniose Visceral por município de infecção	32
Figura 8. Macho de <i>Lu. longipalpis</i> apresentando variação morfológica no tergito	36
Figura 9. Diferentes tipos de cantos para cópula relacionadas ao complexo <i>Lu. Longipalis</i>	37
Figura 10. Representação esquemática do ciclo de vida dos flebotomíneos	39
Figura 11. Repelência de flebotomíneos em cães encoleirados	48
Figura 12. Evolução da resistência em uma população de insetos	53
Figura 13. Principais mecanismos de resistência	55
Figura 14. Mapa do Brasil mostrando os estados e seus municípios onde foram realizadas as coletas e bioensaios com garrafas do CDC para avaliação de suscetibilidade de <i>Lu. longipalpis</i> expostos ao inseticida deltametrina, em 2023	64
Figura 15. Áreas de coletas de <i>Lu. longipalpis</i> mostrando os diferentes ambientes de ocorrência nos seguintes estados	65

Figura 16. Armadilhas luminosas utilizadas para captura de flebotomíneos	66
Figura 17. Processo de impregnação das garrafas do CDC com as diferentes doses de deltametrina	68
Figura 18. Experimentos de suscetibilidade com garrafas do CDC. (A) Retirada dos flebotomíneos das gaiolas	70
Figura 19. Transferência dos flebotomíneos após 60 minutos de exposição. (A) Parafilm sendo utilizado no lugar da tampa	71
Figura 20. Média de mortalidade para doses respostas ao piretróide deltametrina com 60 min de exposição	80
Figura 21. Curva de mortalidade de populações de <i>Lu. longipalpis</i> , em escala logarítmica, para o inseticida deltametrina	85
Figura 22. Curva de mortalidade de populações de <i>Lu. longipalpis</i> , em escala logarítmica, para o inseticida deltametrina	86

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resumo dos principais medicamentos usados para LV **27**
- Tabela 2.** Critérios para a incorporação das coleiras impregnadas com inseticida fornecida pelo MS para os municípios brasileiros **50**
- Tabela 3.** Distribuição das espécies de flebotomíneos coletadas por meio de armadilhas luminosas em áreas com uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4%, conforme sexo, estado e município de coleta, em 2023 **75**
- Tabela 4.** Taxa de mortalidade de populações de flebotomíneos expostos a DD de 21 µg/garrafa de deltametrina em bioensaios de garrafas do CDC, em 2023 **77**
- Tabela 5.** Taxa de mortalidade de populações de flebotomíneos expostos a DD de 30 µg/garrafa de deltametrina em bioensaios de garrafas do CDC, em 2023 **78**
- Tabela 6.** Distribuição da população, número de exemplares por amostra, Slope, DL₅₀, DL₉₅, RR₅₀ e RR₉₅ de populações de *Lu. longipalpis* expostas ao piretróide deltametrina em bioensaios de garrafa do CDC, em 2023 **84**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC. Centro de Controle e Prevenção de Doenças

DTNs. Doenças Tropicais Negligenciadas

DD. Dose Diagnóstica

DR. Dose Resposta

DDT. Dietildicloro difeniltricloroetano

DL. Dose Letal

IRAC. Comitê de Ação à Resistência a Inseticidas

LV. Leishmaniose Visceral

LVC. Leishmaniose Visceral Canina

LRS. Linhagem Referência de Suscetibilidade

Lu. *Lutzomyia*

MS. Ministério da Saúde

RR. Razão de Resistência

OMS. Organização Mundial de Saúde

OPAS. Organização Pan-americana de Saúde

µg. Microgramas

ORGÃOS FINANCIADORES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A Coordenação-Geral de Vigilância de Zoonoses e Doenças de Transmissão Vetorial/DEDT/SVSA/MS.

Índice

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Leishmaniose Visceral	20
1.2 Epidemiologia da LV	28
1.3 Aspectos taxonômicos de flebotomíneos e o complexo <i>Lu. longipalpis</i>	32
1.4 Ecologia dos flebotomíneos	38
1.5 Vigilância e Controle de Flebotomíneos	40
1.5.1 Controle químico	44
1.5.2 Coleiras impregnadas com deltametrina	47
1.6 Resistência de flebotomíneos a inseticidas	52
2 JUSTIFICATIVA	61
3 OBJETIVOS	62
3.1 Objetivo geral	62
3.2 Objetivos específicos	62
4 MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1 População de referência	63
4.2 Flebotomíneos de campo	63
4.3 Impregnação das Garrafas	67
4.4 Bioensaios de garrafas DD	68
4.5 Bioensaios de garrafas DR	70
4.6 Critérios de mortalidade	72
4.6 Análise estatística	72
5 RESULTADOS	74
5.1 Flebotomíneos expostos em garrafas do CDC	74

5.2 Bioensaios com utilização de DD.....	76
5.3 Perfil de suscetibilidade de populações de campo de <i>Lu.</i> <i>longipalpis</i>.....	79
6 DISCUSSÃO.....	87
7 CONCLUSÃO.....	95
8 REFERÊNCIAS.....	96
Apêndice I.....	110
Apêndice II.....	112
Apêndice III.....	113
Apêndice IV.....	114

Resumo

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) afetam principalmente, mas não exclusivamente, populações pobres nas regiões mais vulneráveis e miseráveis do planeta. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde cerca de um bilhão de pessoas são atingidas pelas DNTs em países tropicais. A Leishmaniose Visceral (LV) é uma antropozoonose predominante em áreas tropicais e subtropicais. A LV ocupa a segunda posição em mortalidade e a sétima em perda de anos de vida ajustados por incapacidade entre as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs). O principal vetor da LV é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* e os cães (*Canis familiaris*) são os principais reservatórios domésticos do protozoário *Leishmania infantum*. O uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4%, associada à tratamento químico contra *Lu. longipalpis* pode contribuir para o surgimento de resistência em flebotomíneos. Nesse contexto, o objetivo foi caracterizar o perfil de suscetibilidade de diferentes populações de *Lu. longipalpis* ao piretróide deltametrina em áreas com uso de coleiras impregnadas para controle de LV. A população suscetível de *Lu. longipalpis* foi procedente do insetário do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos do Instituto Oswaldo Cruz/RJ. As populações de campo foram oriundas dos municípios de Foz do Iguaçu/PR (FOZ), Teresina/PI (TER), Fortaleza/CE (FOR), Caucaía/CE (CAU), Montes Claros/MG (MOC) e Cavalcante/GO (CAV). Os flebotomíneos foram coletados com armadilhas luminosas do tipo CDC e/ou HP instaladas em peridomicílio durante 3 noites consecutivas, entre 17:00 às 8:00 horas. Populações de campo foram expostas aos bioensaios de garrafa do CDC (Wheaton de 250 ml) impregnadas com DD de 21,9 µg/garrafa e 30 µg/garrafa. Para os experimentos de Dose-Resposta (DR) foram utilizadas as doses de 1, 3, 5, 7, 9 e 11 µg/garrafa de deltametrina. As garrafas do grupo controle foram impregnadas somente com acetona. Foram utilizados em média de 20 flebotomíneos (♂♂ e ♀♀ misturados) por garrafa e o tempo de exposição foi de 60 minutos. Três bioensaios foram conduzidos em diferentes dias e a leitura de mortalidade foi de 24h realizada por um único pesquisador.

Um total de 4.094 flebotomíneos foram utilizados nos bioensaios de garrafas do CDC. *Lu. longipalpis* foi a espécie mais frequentemente coletada em todas as localidades (94%), seguidas por *Migonemyia migonei* (0,7%), *Evandromyia lenti* (0,5%), *Evandromyia sallesi* (0,3%), *Nyssomyia whitmani* (0,1%). Para DD de 21,9 µg/garrafa as populações procedentes dos municípios de FOZ, MOC, CAV e TER foram suscetíveis, enquanto que CAU apresentaram mortalidade de 87,1%, sugerindo resistência e FOR demonstrou um valor de 94,9% sugerindo possível resistência. Para a DD de 30 µg/garrafa, CAU e TER apresentou possibilidade de resistência, porém as demais populações foram suscetíveis. RR₅₀ variou entre 2,27 a 0,54 e a RR₉₅ entre 4,18 e 0,33, apontando baixa resistência. Os valores do coeficiente angular das populações de flebotomíneos de TER, CAU, FOR e MOC apresentaram menor homogeneidade e maior frequência de indivíduos que apresentaram resistência. O tempo de implantação das coleiras em cada município pode ter influenciado a suscetibilidade das populações analisadas. Sugere-se a utilização da população CAV como uma população de referência para futuros estudos de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas. Conclui-se que a maioria das populações de *Lu. longipalpis* foram suscetíveis ao piretróide deltametrina em áreas com uso de coleiras impregnadas, exceto a população de Caucaia/CE que foi resistente na DD de 21, 9 µg/garrafa. O monitoramento de resistência de *Lu. longipalpis* deve ser realizado para novas áreas, a fim de subsidiar as ações de controle da LV, no Brasil.

Palavras-chave: *Lutzomyia longipalpis*, Leishmaniose Visceral, Resistência.

Abstract

Visceral Leishmaniasis (VL) is an important public health problem with autochthonous cases registered in 24 Brazilian states. The main vector of VL is the sandfly *Lutzomyia longipalpis* and dogs (*Canis familiaris*) are the main domestic reservoirs of the protozoan *Leishmania infantum*. The use of collars impregnated with 4% deltamethrin is associated with chemical control against *Lu. longipalpis* which may contribute to the emergence of resistance in sandflies. In this work, the susceptibility profile of different *Lu. longipalpis* populations to pyrethroid deltamethrin in areas where impregnated collars are used to control VL was characterized. The susceptible population of *Lu. longipalpis* originated from the insectarium of the Insect Biochemistry and Physiology Laboratory of the Oswaldo Cruz Institute/RJ. The field populations came from the cities of Foz do Iguaçu/PR (FOZ), Teresina/PI (TER), Fortaleza/CE (FOR), Caucaía/CE (CAU), Montes Claros/MG (MOC) and Cavalcante/GO (CAV). Sandflies were collected using CDC and/or HP- type light traps installed in peridomicile during 3 consecutive nights, between 5 pm and 8 am. Field populations were exposed to CDC bottle bioassays (Wheaton de 250 ml) impregnated with DD at 21.9 ug/bottle and 30 µg/bottle. Dose-Response (DR) experiments, using doses of 1, 3, 5, 7, 9 and 11 µg/bottle were conducted. The bottles in the control group were impregnated only with acetone. An average of 20 sandflies (♂♂ and ♀♀ mixed) per bottle were used and the exposure time was 60 minutes. Three bioassays were conducted on different days, and the mortality reading was 24 hours carried out by a single researcher. A total of 4,094 sandflies were used in the CDC bottle bioassays. *Lu. longipalpis* was the most frequently collected species in all localities (94%), followed by *Migonemyia migonei* (0.7%), *Evandromyia lenti* (0.5%), *Evandromyia sallesi* (0.3%) and *Nyssomyia whitmani* (0.1%). For DD of 21.9 µg/bottle, populations from the cities of FOZ, MOC, CAV and TER were susceptible, while CAU presented a mortality rate of 87.1%, suggesting resistance and FOR demonstrated a value of 94.9%, suggesting possible

resistance. For the DD of 30 µg/bottle, CAU and TER showed the possibility of resistance, but the other populations were susceptible. RR₅₀ varied between 2.27 and 0.54 and RR₉₅ between 4.18 and 0.33, indicating low resistance. The angular coefficient values of the TER, CAU, FOR and MOC sandfly populations showed less homogeneity and a higher frequency of individuals with resistance alleles. The length of time collars were implemented in each city may have influenced the susceptibility of the populations analyzed. It is suggested to use the CAV population as LRS for future studies on the susceptibility of sandflies to insecticides. The majority of populations of *Lu. longipalpis* were susceptible to the pyrethroid deltamethrin in areas where impregnated collars were used, except the Caucaia/CE population which was resistant to the DD of 21.9 µg/bottle. Resistance monitoring of the *Lu. longipalpis* should be carried out in new areas, in order to support VL control actions in Brazil.

Keywords: *Lutzomyia longipalpis*, Visceral Leishmaniasis, Resistance.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma antropozoonose predominante em áreas tropicais e subtropicais. Trata-se de uma condição sistêmica que afeta principalmente os grupos etários mais susceptíveis, como crianças menores de cinco anos e adultos maiores de 50 anos, bem como pessoas que apresentam comorbidades ou imunocomprometidas, como HIV/aids (Silva et al. 2021, Martins et al. 2021).

A LV possui uma grande importância em saúde pública, sendo considerada uma doença potencialmente fatal, que é transmitida por vetores, conhecidos como flebotomíneos. A LV ocupa a segunda posição em mortalidade e a sétima em perda de anos de vida ajustados por incapacidade entre as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) (Scarpini et al. 2022).

O agente etiológico da LV são protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* e família Trypanosomatidae. Essa família possui 19 gêneros, a qual destaca-se os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* por apresentarem importância em saúde pública (Kaufer et al. 2017). O gênero *Leishmania* é um grupo de mais de 20 espécies de protozoários parasitas. Essas espécies produzem as leishmanioses em humanos, mas também infectam outros hospedeiros mamíferos. O termo leishmaniose abrange uma ampla gama de manifestações clínicas, podendo se manifestar em três tipos: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucosa e LV (Franssen et al. 2020, Aroson et al. 2016, Akhoundi et al. 2016). A LV é desencadeada por duas espécies do complexo Donovanii: *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*, sendo essa última também chamado *Leishmania chagasi* na América do Sul.

L. donovani está presente na Ásia (Bangladesh, Nepal e Sudão) e na África (Sudão, Etiópia). Em países Asiáticos a LV recebe o nome de “Calazar” devido o escurecimento da pele (que significa febre negra em hindi) (Arason, Magali

2020, Pedrosa 2017, Brasil 2014, WHO 2010). Por outro lado, *L. infantum* abrange a Bacia do Mediterrâneo, o Médio Oriente, a Ásia Central, a América do Sul e a América Central, representando a forma sistêmica mais grave e geralmente fatal, a menos que seja devidamente tratada (Scarpini et al. 2022, Burza et al. 2018).

L. infantum é transmitida pela picada de fêmeas infectadas de flebotomíneos. Os flebotomíneos inoculam formas de protozoários chamados promastigotas infectantes em um mamífero suscetível durante o repasto sanguíneo. Essas promastigotas são fagocitadas por macrófagos e se transformam-se em amastigotas (obrigatoriamente parasita intracelular) multiplicando-se dentro das células por meio de divisão simples. As amastigotas rompem os macrófagos e são liberados em meio extracelular, onde são novamente fagocitados. Nesse contexto, acabam por infectar órgãos linfoides secundários (baço, linfonodos), fígado e medula óssea. Quando um flebotomíneo alimenta-se de uma pessoa ou animal infectado, acaba ingerindo macrófagos com amastigotas, que por sua vez no intestino médio do inseto são transformadas em promastigotas, e posteriormente em promastigotas metacíclicas infectantes nas glândulas salivares do flebotomíneo (Serafim et al. 2019, CDC 2017, Oliveira et al. 2015, Esch, Petersen 2013). A Figura 1 mostra o ciclo de vida das espécies de *Leishmania*.

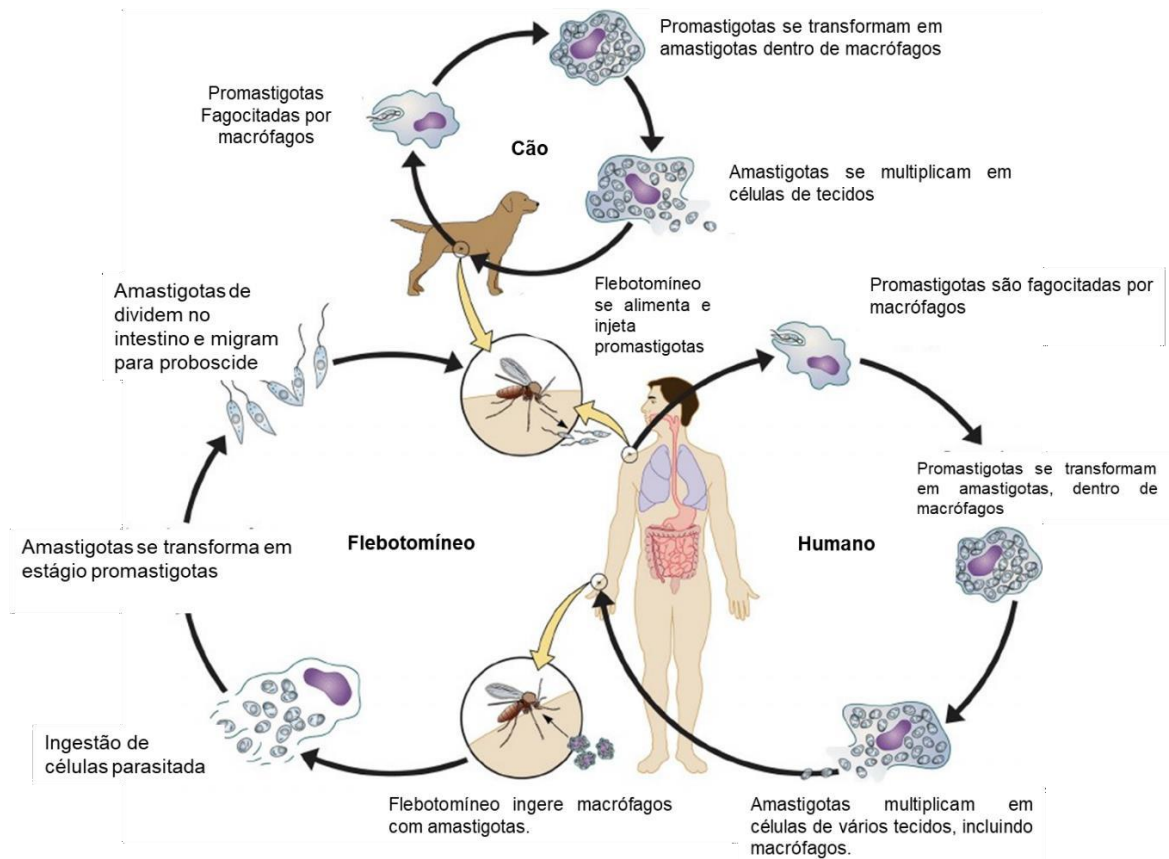


Figura 1. Ciclo de vida da espécie *L. infantum*. Fonte: Adaptado de Esch, Petersen, 2013.

L. infantum, como a maioria das espécies de *Leishmania* produz uma doença zoonótica, no qual os cães domésticos são os principais reservatórios. Entretanto, animais silvestres como, primatas, roedores e morcegos também podem estar envolvidos na transmissão (Sáez et al. 2014).

O período de incubação da LV, em humanos, normalmente varia de 2 a 6 meses, mas pode variar de semanas a vários anos. A fase inicial ou aguda da LV inclui febre com duração inferior a quatro semanas, palidez e hepatoesplenomegalia, sendo mais frequente o aparecimento em crianças menores de 2 anos. É durante esse período que ocorre a disseminação do parasita, sendo observado o aumento do baço, com uma dilatação de 4cm por

mês, o abdômen fica visualmente grande, com um fígado aumentado, fraqueza, emagrecimento progressivo, perda de tecido adiposo e músculo ósseo (Figura 2). O período final da LV apresenta um quadro mais intenso com hemorragias, desnutrição, pele seca, cabelos frágeis e quebradiços, opacidade e palidez. Com isso, a doença pode evoluir para óbito caso não seja realizado o diagnóstico e tratamento adequados (Arason, Magali 2020, Pedrosa 2017, Brasil 2014, WHO 2010).

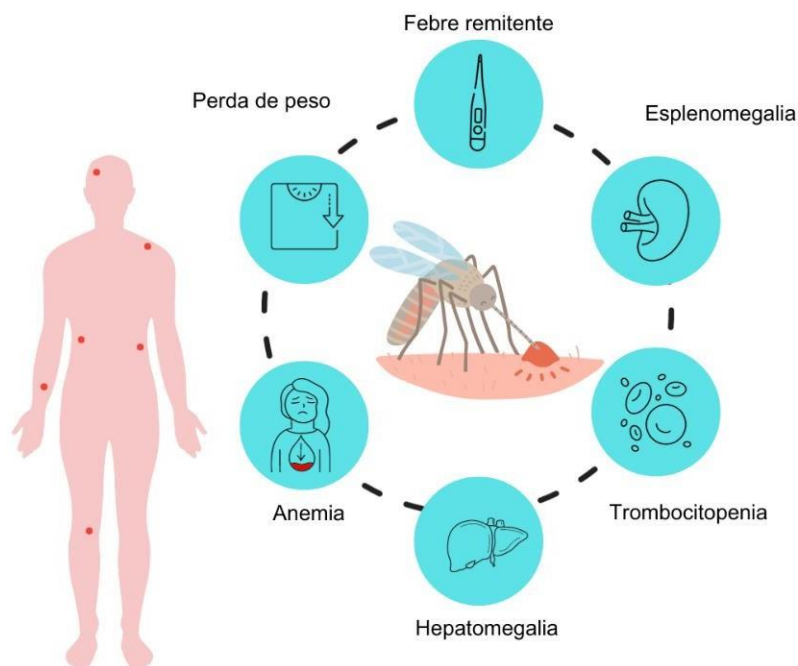


Figura 2. Principais manifestações clínicas da Leishmaniose Visceral. Fonte:
Elaborado pela autora.

Além da Leishmaniose Visceral Humana (LVH), a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) impacta negativamente a sociedade do ponto de vista médico, veterinário e social. No que diz respeito ao espectro clínico da LVC, apresenta-se com uma evolução lenta e início insidioso, variando em relação ao quadro clínico, desde aparentemente saudáveis até criticamente doente, que pode culminar na morte do cão, pois, com a infecção os parasitas se proliferam em muitos órgãos viscerais, chegando eventualmente a se distribuir através da pele do animal (Silveira et al. 2021, Travi et al. 2018, Ribeiro et al. 2013).

Clinicamente, os cães infectados são divididos em três grupos: i) Assintomáticos, com ausência de sinais clínicos visíveis para infecção por *Leishmania*. ii) Oligossintomáticos, apresenta alguns sinais clínicos, como adenopatia linfóide, pequena perda de peso e pelo opaco. iii) Sintomáticos: todos sinais mais comuns da doença como as alterações cutâneas (Brasil, 2014). Os sinais clínicos da LVC incluem atrofia muscular, lesões periorbitais e nasais, dermatite, febre, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, hemorragias, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e ulceração do nariz, orelhas e cauda (Carneiro et al. 2023). Na Figura 3 pode se observar os principais sinais clínicos em um cão infectado por LVC.



Figura 3. Cão com LVC, apresentando apatia, alopecia e lesões no corpo.

Fonte: Ministério da Saúde (2014).

No geral, o diagnóstico clínico da LV é desafiador, podendo se assemelhar a diversas doenças infecciosas hematológicas, como febre tifóide, tuberculose, brucelose e malária. Devido à elevada especificidade o diagnóstico parasitológico continua sendo o padrão-ouro da LV, com a detecção de formas amastigotas em esfregaços de tecidos (linfáticos, medula óssea ou baço), por meio da técnica de coloração com Giemsa. O diagnóstico sorológico evidencia a presença de anticorpos específicos desenvolvidos em resposta à infecção pelo parasita. Diferentes técnicas podem ser utilizadas, incluindo: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), onde os anticorpos interagem com enzimas; Teste de Aglutinação Direta (DAT), neste teste, promastigotas são preparados com soros dos pacientes, com aglutinação sendo observada. É um método altamente específico, sensível, barato e simples. Diagnóstico molecular por meio do método do PCR (amplificação do DNA do parasita), pode ser realizado em amostras biológicas, como sangue, tecidos ou aspirados de medula óssea e amostras de camada leucocitária com alta sensibilidade (Safavi et al. 2020, Arason et al. 2016, Srivastava et al. 2011, Sundar, Rai 2002). A Figura 4 representa os principais métodos de diagnóstico da LV.

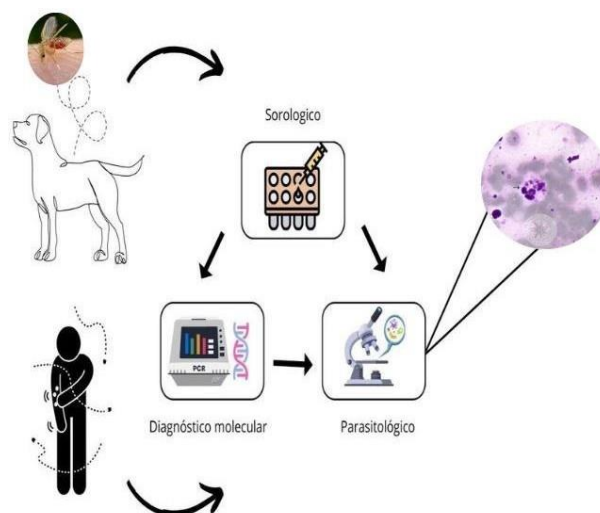


Figura 4. Métodos de diagnóstico da LV. Fonte: Elaborado pela autora.

O tratamento da LV ainda é muito limitado e insatisfatório, sendo que os principais compostos disponíveis para uso são antimoniais pentavalentes como estibogluconato de sódio, antimoniato de meglumina, paromomicina, miltefosina e o anfotericina B lipossomal (Scarpini et al. 2022, Pradhan et al. 2022). No Brasil, o tratamento de primeira linha é realizado utilizando o antimoniato de meglumina, apesar de apresentar alta toxicidade, levando em alguns casos a morte dos pacientes, como também foi comprovado sua resistência em alguns países. O anfotericina B lipossomal é o tratamento de segunda linha e tem indicações amplas, apresentando alto percentual de cura, que varia de acordo com a dose. É importante mensurar que a indicação de determinado medicamento varia de acordo com cada região geográfica, consenso entre especialistas e dependendo da gravidade da doença (Ibiapina et al. 2022, Scarpini et al. 2022, Pradhan et al. 2022, Alves et al. 2018). A Tabela 1 resume as opções de tratamento para LV.

Tabela 1. Resumo dos principais medicamentos usados para LV.

Medicamentos	Administração	Dosagem	Vantagens	Desvantagens
Estibogluconato de sódio	Intravenoso	20 mg/kg por 28 a30 dias	Preparações genéricas	Toxicidades (vômitos, cardíacas, hepáticas)
Antimoniato de meglumina	Intravenoso	20 mg/kg/dia 20 dias	Fácil disponibilidade (em áreas endêmicas); baixo custo	Toxicidade, aplicação dolorosa, duração do tratamento, resistência.
Anfotericina B lipossomal	Intravenoso	10–30 mg/kg (dose única; 3–5 mg/kg/dose)	Alta eficácia; baixo toxicidade	Preço elevado, infusão intravenosa lenta
Paromomicina	Intravenoso	15 mg/kg/dia, mas requer um curso de 21 dias.	Taxas de cura equivalentes à Anfoterecina B	Nefrotóxico e ototóxico
Miltefosina	Oral	2–2,5 mg/kg/diariamente durante 28 dias	Boa eficácia em pacientes sem HIV	Teratogênico, preço elevado, possível de resistência

Adaptado de Pradhan et al (2022).

1.2 Epidemiologia da LV

Embora endêmica em regiões geográficas específicas, a ocorrência global da LV está amplamente dispersa em todos os continentes, exceto na Oceania. Populações socialmente menos favorecidas apresentam maior prevalência de casos de LV, principalmente em áreas rurais e periurbanas. A distribuição no mundo concentra-se em 90% dos casos em seis países: Brasil, Índia, Bangladesh, Sudão, Etiópia e Nepal, entretanto a doença permanece endêmica em mais de 60 países. Desse modo, admite-se que cerca de 350 milhões de pessoas estejam sob risco de contrair a infecção. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que ocorram, a cada ano, 50 mil a 90 mil casos novos desse agravo, porém apenas 25% a 45% são notificados (Martins et al. 2021, Batista et al. 2018, Burza et al. 2018). A figura 5 mostra a distribuição geográfica da LV.

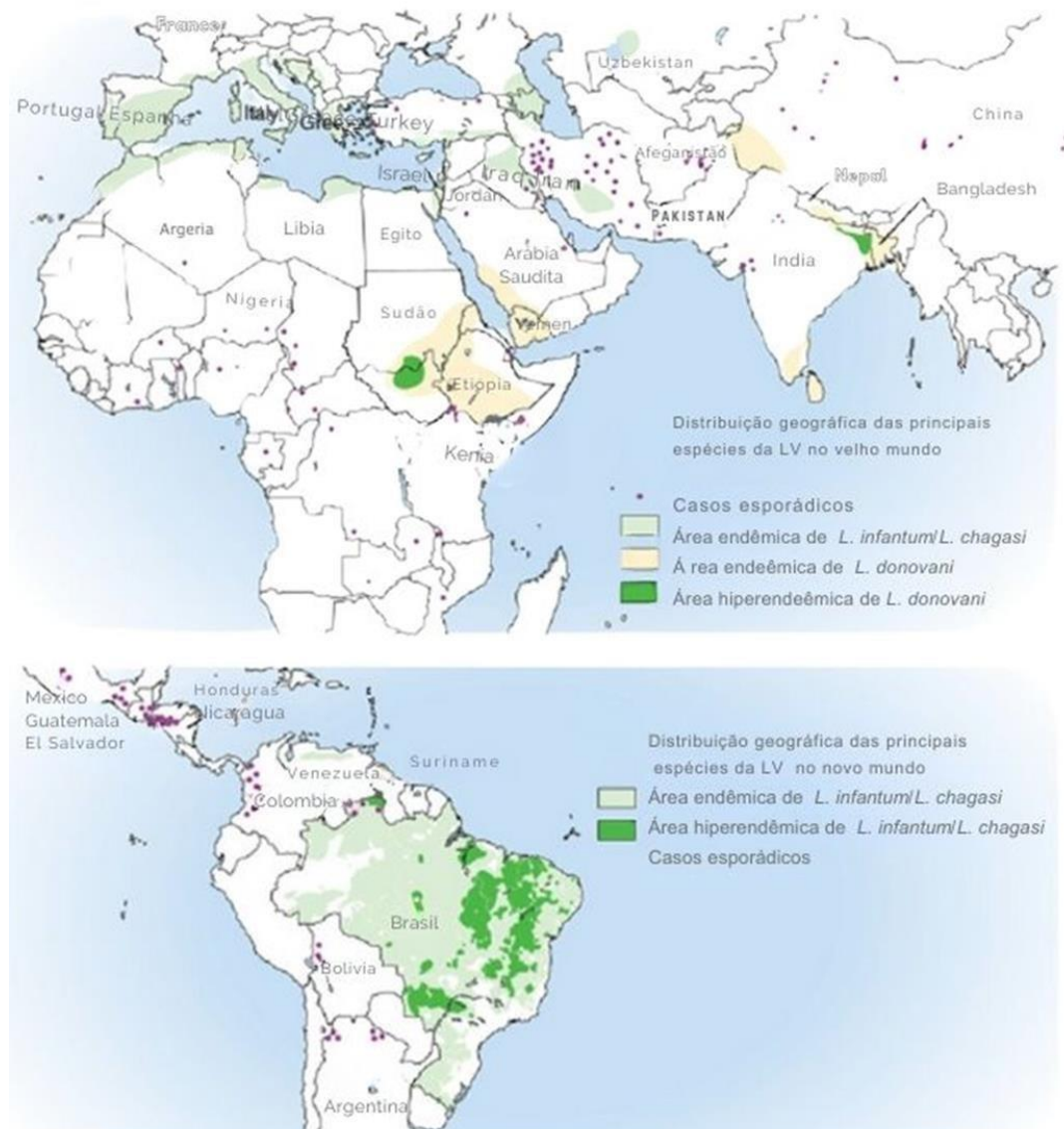


Figura 5. Mapas de distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral.

Fonte: Arason et al. (2016).

Foi observada uma tendência mundial crescente no número de casos de LV notificados à OMS, entre 1998 e 2005, atingindo inicialmente um pico de 62.730 casos notificados em 2005. O número de casos de LV permaneceu estável a nível mundial, entre 2005 e 2007, mas continuou a atingir o pico na

região do Sudeste Asiático. O número de casos notificados, em nível mundial, diminuiu acentuadamente, entre 2007 e 2009, em todas as regiões: Região Africana, Região das Américas, Região do Mediterrâneo Oriental, Região Europeia, Região do Sudeste Asiático e Região do Pacífico Ocidental. Entre 2015 a 2016, foi observado um aumento de casos na África Ocidental com 9.602 casos (40%) em 2015 para 11.216 casos (50%) em 2016. No subcontinente indiano, entretanto, o número de casos diminuiu, de 9.261 casos (39%) em 2015 para 6.746 casos (30 %) em 2016. O Brasil permaneceu estável entre os anos de 2015 e 2016, com o número de casos em, 3.289 (14%) e 3.200 (14%) casos, respectivamente (Scarpin et al. 2022, Wilen et al. 2018).

No período de 2001-2021, houveram 69.665 casos novos de LV na Região das Américas, com uma média anual de 2.488 casos confirmados. Nos anos de 2001 e 2010, registrou-se um aumento de casos de LV em toda a Região, exceto na Colômbia. No entanto, entre 2011 e 2021, a tendência foi decrescente, sendo registrados 1.799 casos de LV em 2021, porém houve um aumento significativo no número de casos, em relação a 2020 em alguns países: Venezuela (400%), Paraguai (123%) e Argentina (45,5%) (OPAS 2022), de acordo com a Figura 6.

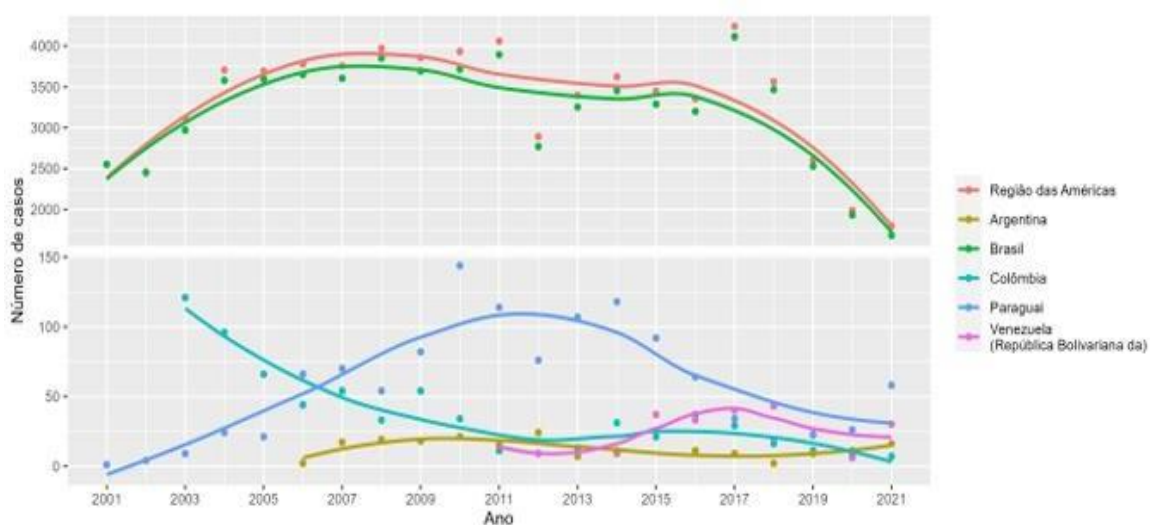


Figura 6. Número de casos registrados de leishmaniose visceral, Região das Américas, 2001-2021. Fonte: Organização Pan-Americana da Saúde (2022).

No Brasil, LV era considerada eminentemente típica de zonas rurais com cerca de 90% dos casos notificados na região Nordeste. Entretanto, com o aumento das péssimas condições sanitárias, associadas as condições climáticas ambientais e socioculturais, colaboraram para o processo de urbanização do vetor *Lutzomyia longipalpis*, a qual adaptou-se com sucesso aos diferentes ambientes urbanos (Salomón et al. 2015). Desse modo, desde a década de 80, a LV tem se expandido para as demais regiões brasileiras, com destaque para a Região Sudeste. Assim, 96% dos casos de LV nas Américas é reportado no Brasil, onde durante o período de 2007 a 2017, o coeficiente de incidência de LV foi de 1,7 a 2,0 casos novos por 100 mil habitantes, enquanto a taxa de letalidade aumentou de 5,9% para 8,8%. (Costa et al. 2018, Salomón et al. 2015). Segundo Silva (2021), de 2000 a 2019, a maioria dos casos no Brasil foi registrada na região Nordeste (54%), seguida pelas regiões Norte (17%) e Sudeste (16%).

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (2022) os cinco municípios que registraram o maior número de casos, em 2021, continuam sendo Fortaleza (Ceará), Belo Horizonte (Minas Gerais), São Luís (Maranhão), Araguaína (Tocantins) e Parauapebas (Pará). As cinco maiores taxas de incidência também foram registradas no Brasil, embora não nos mesmos municípios que no ano anterior: Couto Magalhães, Carmolândia e Pau D'Arco, em Tocantins, Uiramutã, em Roraima, e Cavalcante, em Goiás. No ano de 2022, foi registrado no Brasil 1.684 casos confirmados de LV. A região Nordeste apresentou os maiores casos, sendo 731, com destaque para os Estados no Maranhão e Ceará que registraram 225 e 181 casos respectivamente (Sinan/SVSA/MS, 2023). A Figura 7 mostra casos de LV por município de infecção (Brasil 2022).

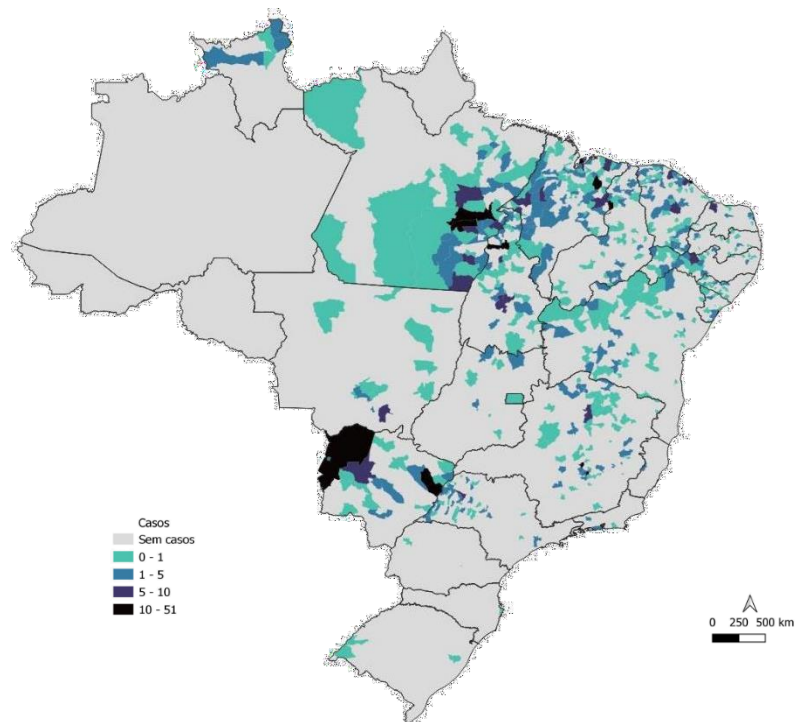


Figura 7. Casos de Leishmaniose Visceral por município de infecção. Brasil, 2022. Fonte: SVSA/MS (2023).

1.3 Aspectos taxonômicos de flebotomíneos e o complexo *Lu. longipalpis*

Os flebotomíneos pertencem à classe Insecta, ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. São insetos pequenos com comprimento de corporal geralmente não superior a 3 mm e com grande importância na saúde pública, pois estão associados na transmissão de

protozoários do gênero *Leishmania*, que causam a LV. Essa transmissão ocorre exclusivamente por meio de fêmeas infectadas durante o repasto sanguíneo. Essa alimentação é necessária para o desenvolvimento dos seus ovos (Galati 2018, Bastos et al 2016).

Até 1940, foram descritas 33 espécies de flebotomíneos, com sua taxonomia podendo ser explicada em dois períodos distintos. Em um primeiro momento, estruturas de morfologia externas como genitália e características como venação das asas eram utilizadas para classificação dos táxons. No segundo momento, Adler e Theodor (1926) utilizaram morfologia interna como: cibário, faringe e espermateca em fêmeas para descrição de espécies. Theodor (1948) dividiu os flebotomíneos em dois gêneros: *Phlebotomus* e *Sergentomyia*. Lewis et al (1977), propuseram a subdivisão de Phlebotominae em seis gêneros, sendo dois para espécies do Velho Mundo, *Phlebotomus*, *Chinius* e *Sergentomyia*, e três gêneros para espécies do Novo Mundo, *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya*. Posteriormente Young e Duncan (1994) subdividiu os flebotomíneos neotropicais em *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya*. Galati (1995), baseado em uma análise filogenética sistemática de caracteres morfológicos dividiu os flebotomíneos em duas tribos: Hertigiini e Phlebotomini. Sendo este último subdividido em 4 subtribos e 20 gêneros: Brumptomyiina, Sergentomyiina, Lutzomyiina e Psychodopygina. Uma nova classificação para flebotomíneos do novo mundo proposta por Galati (2003) propôs uma nova classificação de flebotomíneos americanos, colocando as espécies em duas tribos, quatro subtribos e em 23 gêneros (Galati, Rodrigues 2023, Andrade et al. 2020, Akhoundi et al. 2016).

Os dípteros da família Psychodidae constituem um grupo diverso em número de espécies e morfologia, ocupando uma ampla gama de nichos ecológicos, com cerca de 3.400 espécies descritas atualmente. A classificação atual de Psychodidae inclui seis subfamílias: Bruchomyiinae Alexander 1921 (74 ssp.) Horaiellinae Enderlein 1937 (6 ssp.); Phlebotominae Rondani e Berté 1840 (1060 ssp.); Psychodinae Newman, 1834 (2050 ssp.); Sycoracinae Jung,

1954 (56 ssp.) e Trichomyiinae Tonnoir 1922 (215 ssp.) e uma subfamília extinta, Datziiinae Stebner et al (Galati, Rodrigues 2023, Curle et al 2019).

Dentre os flebotomíneos, a subfamília Phlebotominae é de relevante interesse médico e veterinário. Cerca de 98 espécies de flebotomíneos são consideradas vetores comprovados ou incriminadas de leishmaniose humana; os gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* se destacam, incluindo 42 espécies no Velho Mundo e 56 espécies no Novo Mundo, respectivamente. No Velho Mundo, os vetores de leishmanioses comprovados ou prováveis são de aproximadamente 42 espécies, sendo que as principais espécies incriminadas na transmissão de LV são, *Phlebotomus argentipes*, *Phlebotomus orientalis* e *Phlebotomus perniciosus*. Dentre os gêneros de flebotomíneos que ocorrem no Novo Mundo, o gênero *Lutzomyia* apresenta uma ampla distribuição geográfica pelo Continente Americano, sendo a espécie *Lu. longipalpis* o principal vetor de LV, com grande importância epidemiológica. Ademais, *Luzomyia evansi*, *Lutzomyia cruzi*, *Lutzomyia almerioi* são vetores incriminados ou suspeitos relacionados a transmissão de LV nas Américas (Maroli et al. 2013, Aklilu et al. 2023).

Um total de 286 espécies de flebotomíneos são registradas no Brasil. Os vetores principais da LV são as espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (Pereira et al. 2022). A espécie *Lu. longipalpis* apresenta uma distribuição espacial diversa, ocorrendo em habitats secos, ambientes florestais, mas especialmente em áreas urbanas/periurbanas e rurais, onde se adaptou e se espalhou com sucesso. Ademais, *Lu. cruzi* é considerado de importância secundária em áreas específicas dos estados do Mato Grosso e do Mato Grosso do Sul (Chaves et al. 2022, Brasil 2022, Rêgo et al. 2021, Andrade et al. 2020).

Lu. longipalpis desempenha um papel fundamental como principal vetor da LV na América. Este flebotomíneo apresenta uma distribuição ampla e descontínua podendo ser localizado em uma variedade de habitats. O isolamento geográfico entre numerosas populações de *Lu. longipalpis*

favorece o processo de divergência genética e especiação desse vetor. Ao estudar flebotomíneos do Brasil, Mangabeira (1969) abriu uma discussão para o *status* taxonômico de *Lu. longipalpis*, que é alvo de grandes discussões, desde o final da década de 1960. Foi demonstrado que machos coletados nos Estados do Ceará e Pará continham diferenças quanto ao número de manchas presentes nos seus tergitos. Uma mancha no tergito IV e outra no tergito III foi observada em espécies dos estados do Ceará, enquanto, espécies do estado do Pará apresentaram um par de manchas claras no tergito IV. Posteriormente, estudos com *Lu. longipalpis* em diferentes populações brasileiras, comprovaram que essa espécie desenvolvia feromônios diferentes entre si, como também apresentou isolamento reprodutivo. Essas análises sustentam a hipótese que *Lu. longipalpis* constituem um complexo de espécies irmãs. Esse complexo pode ser observado desde o norte da Argentina e Uruguai ao México. Gutierrez et al. (2021) buscando investigar o complexo de espécies irmãs de *Lu. longipalpis* por meio códigos de barra de DNA, utilizou exemplares de 10 localidades de 4 países, neste estudo foi sugerido que o complexo *Lu. longipalpis* consiste em pelo menos 8 linhagens que podem representar espécies. Nesse sentido, se ocorre diferenças dentro de uma única “espécie” consequentemente diferentes perfis epidemiológicos e ecológicos podem ser observados, uma vez que os flebotomíneos apresentam hábitos, comportamentos e características específicos (Casaril et al. 2019, Araki et al. 2013, Araki et al. 2009). Na figura 8 é possível observar os padrões de manchas em *Lu. longipalpis*.

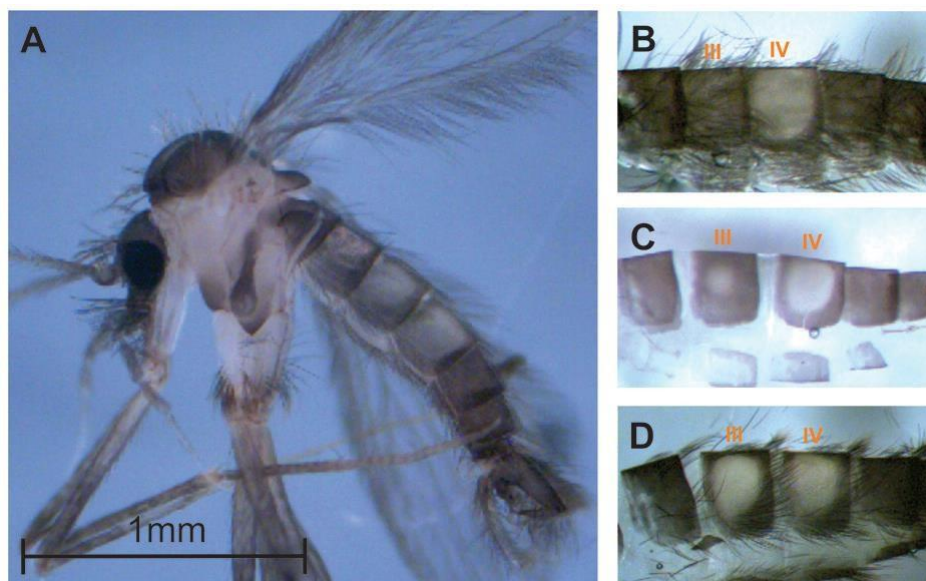


Figura 8. Macho de *Lu. longipalpis* apresentando variação morfológica no tergito. (A) Visão geral do corpo; (B) fenótipo de um ponto; (C) fenótipo intermediário; (D) fenótipo de dois pontos. Fonte: Souza et al (2017).

Ward et al. (1983) obtiveram evidências concretas para apoiar a hipótese de Mangabeira, em seu estudo com populações de *Lu. longipalpis* de Ilha de Marajó/PA, Sobral/CE, Morada Nova/CE e Caverna da Lapinha/MG. Com isso, populações com manchas terciais semelhantes e diferentes foram submetidas a cruzamento que resultaram em falha de inseminação. Esse fato, indicou fortemente a existência de formas adicionais em um aparente complexo de espécies (Souza et al. 2017).

As populações brasileiras do complexo *Lu. longipalpis* podem ser categorizadas em dois grupos distintos, sendo o primeiro machos que produzem cantos de cópula do tipo Burst e o feromônio Cembrene-1/ CEMB-1. O segundo grupo é muito heterogêneo, produzindo diferentes tipos de canto para cópula, como também diferentes feromônios sexuais (Germacreno/ (9MGB, Himachaleno/ 3MdH, Cembrene-1/ CEMB-1 e Cembrene-2/ CEMB-2). Na Figura 9, mostra os diferentes tipos de cantos para o complexo *Lu. longipalpis*.

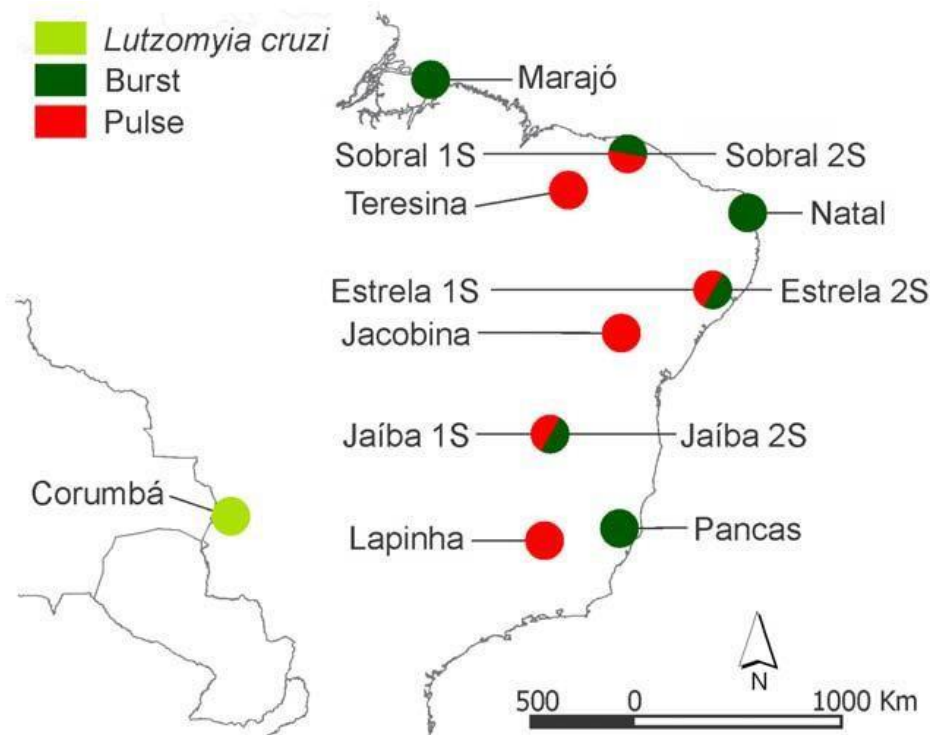


Figura 9. Diferentes tipos de cantos para cópula relacionadas ao complexo *Lu. longipalpis*. Fonte: Lins et al (2012).

As variações de feromônios do complexo *Lu. longipalpis*, podem ser encontrados em diferentes estados brasileiros e Países. CEMB-1: Sobral (CE), Santarém (PA), Estrela de Alagoas (AL), Costa del Sol (AL), Pancas (ES) e Jaíba (MG). CEMB-2: Jaíba (MG). 3MαH: Jacobina (BA), Jequié (BA) também encontrado em *Lu. pseudolongipalpis* (Venezuela). 9MGB: Minas Gerais, Piauí, Rio de Janeiro e São Paulo, bem como em outros países como Argentina, Colômbia, Paraguai, Honduras e Venezuela (Spiegel et al. 2016, Araki et al. 2013).

Populações do complexo *Lu. longipalpis* apontam a existência de pelo menos quatro espécies irmãs: incluindo populações do Brasil, Colômbia, parte da Venezuela e populações da América Central e a existência de pelo menos oito haplogrupos divergentes com alta estrutura filogeográfica. Tais fatos

indicaram que dentro do complexo as espécies podem ter um papel diferente na transmissão e podem ter diferentes capacidades ou preferências vetoriais por cepas específicas de parasitas. Entender a dinâmica desse vetor ao longo de sua distribuição atual é de suma importância para a epidemiologia da doença e para o desenvolvimento de estratégias de controle (Cabrera et al. 2022, Gutierrez et al. 2021).

Nesse trabalho, trataremos as espécies expostas a inseticidas como *Lu. longipalpis* sensu lato, pois em condições de campo foram coletados em diferentes ambientes que são submetidos ao tratamento residual. Num futuro projeto pretendemos analisar a influência de ferormônios na suscetibilidade de populações de campo de *Lu. longipalpis*.

1.4 Ecologia dos flebotomíneos

Os flebotomíneos são encontrados em locais diversos preferencialmente úmidos e com matéria orgânica em decomposição que incluem casas; latrinas; adegas; estábulos; buracos de árvores; tocas de roedores e outros mamíferos. Sendo um vetor facilmente encontrado em áreas de situação socioeconômica vulnerável, adapta-se facilmente às condições peridomiciliares desses locais, explorando o acúmulo de matéria orgânica produzida pelas más condições de saneamento básico. Geralmente é, notável que cães de rua ao adentrar esses ambientes podem ser infectados, pois, ficam expostos com reservatórios silvestres e podem espalhar a infecção para outros cães e humanos quando retornarem à cidade (Brasil 2014, Amora et al. 2009).

Ao contrário de outros dípteros, os flebotomíneos não apresentam uma fase aquática no seu ciclo de vida. São holometábolos, ou seja, seu ciclo de vida passa por quatro estágios principais: ovos, larvas, pupas e adultos. No período de 4 a 20 dias acontece a oviposição, após esse processo inicia-se a

fase de larva, que é constituída por quatro instares larvais, momento esse, relativamente lento sendo concluído em 20 a 30 dias, dependendo das condições como, temperatura e disponibilidade de alimento. Em seguida é fase de pupação, onde não acontece alimentação e geralmente leva de seis a 13 dias, com os adultos emergindo pouco antes do amanhecer. Normalmente, a oviposição ocorre entre cinco e oito dias após a alimentação sanguínea (Cecilio et al. 2022, Kendrick 1999). O ciclo de vida dos flebotomíneos está esquematizado na Figura 10.

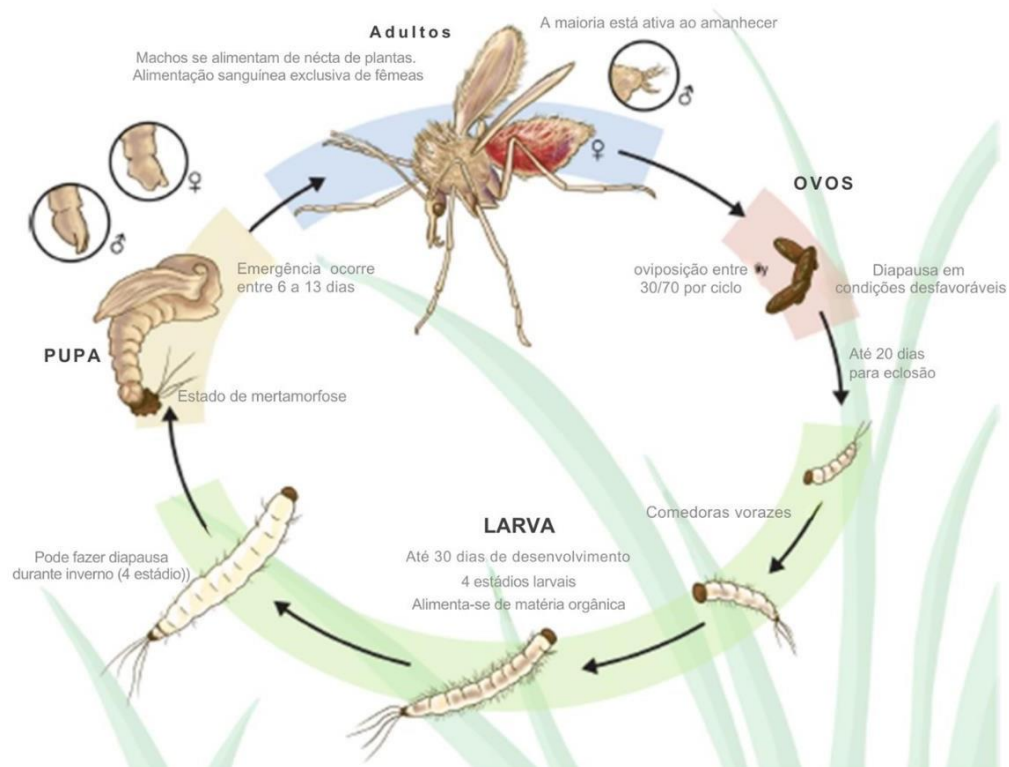


Figura 10. Representação esquemática do ciclo de vida dos flebotomíneos. O ciclo de vida do flebotomíneo compreende quatro estágios principais: ovos, larvas, pupas e adultos. Fonte: Cecilio, Cordeiro, Oliveira, (2022).

A maioria das espécies dos flebotomíneos são ativos ao entardecer e durante a noite, quando a temperatura cai e a umidade aumenta, embora possam picar em locais fechados e durante o dia. As fêmeas são hematófagas e se alimentam de sangue para maturação dos seus ovos. É durante esse processo que pode acontecer a transmissão de patógenos, no entanto, tanto os flebotomíneos machos quanto as fêmeas se alimentam de néctares de flores, frutos e secreções açucaradas. Essa alimentação a base de carboidratos auxilia no ganho de energia e amadurecimento dos ovários. Ademais, fatores como temperatura e umidade podem influenciar no momento das atividades alimentares desses insetos, pois, com temperaturas mais baixas e a maior disponibilidade de alimento durante o instar larval, como folhas caídas no outono favorecem pupação em massa (ECDC 2014, Amora et al. 2009, Sherlock 2003).

Os flebotomíneos adultos possuem pernas longas e o corpo com aspecto densamente piloso e geralmente são de cor parda, daí o apelido “mosquito palha”. A depender da região pode levar outros nomes como: “asa branca, asa dura, bererê, birigui, cangalha, cangalhinha, flebótomo, frebóti, furrupa, ligeirinho, mosquito-palha, orelha-de-veado, péla-égua, tatuíra e tatuquira (Rocha 2019). Apresentam uma capacidade de voo limitada e em forma de salto, fato esse que não permite que esse vetor percorra grandes distâncias, podendo chegar até 200m, essa baixa dispersão sugere que esses insetos pouco se afastam de seus abrigos naturais (Gálvez et al. 2018, ECDC 2014, Santos 2014, Pace 2014).

1.5 Vigilância e Controle de Flebotomíneos

No Programa de Controle da Leishmaniose Visceral, o objetivo principal da vigilância entomológica é realizar levantamento da presença de flebotomíneos em caráter quantitativo e qualitativo (Brasil 2014). Os

indicadores quantitativos direciona-se para aspectos organizacionais, físicos, financeiros, administrativos e jurídicos, ou seja, o necessário para o desenvolvimento do serviço, enquanto que os qualitativos são o enriquecimento e interpretação dos dados obtidos por meio do levantamento realizado pelas equipes de vigilância (Sena 2011).

Segundo Gomes (2002) a Vigilância Entomológica pode ser definida como:

Contínua observação e avaliação de informações originadas das características biológicas e ecológicas dos vetores, nos níveis das interações com hospedeiros humanos e animais reservatórios, sob a influência de fatores ambientais, que proporcionem o conhecimento para detecção de qualquer mudança no perfil de transmissão das doenças.

Gomes (2002) apresenta algumas concepções da vigilância entomológica:

- identificar espécies de vetores por meio de caracteres morfológicos e biológicos com vista à definição de hábitos e comportamento implicados na transmissão de doença;
- detectar precocemente espécies exóticas e, nas autóctones, o nível de domiciliação ou o grau de contato homem-inseto necessário à medida da capacidade vetorial;
- identificar situações ambientais e climáticas que favoreçam a reprodução e as estações mais sujeitas à disseminação de patógenos.

O Ministério da Saúde busca confirmar a presença e comportamento de vetores da LV, preconizando atividades entomológicas tais como: investigação, levantamento e monitoramento entomológico. O levantamento entomológico, é uma atividade qualitativa, que compreende a coleta de

flebotomíneos em áreas silenciosas, em municípios com transmissão esporádica, moderada ou intensa e que não tenham sido realizadas investigações anteriores, coletas essas realizadas por meio de armadilhas luminosas. A investigação é uma atividade qualitativa, que vai confirmar em determinado município a ocorrência do primeiro caso de LV ou que se apresenta em situações de surto. Esse método deve ser feito em um período curto dentro das residências, baseia-se em encontrar flebotomíneos em paredes e dormitórios com a utilização de coleta manual sendo realizada em um período de 3 noites consecutivas. Com características quantitativas e qualitativas o monitoramento entomológico, avalia determinar curvas sazonais para determinada região e conhecer a dispersão das espécies transmissoras da LV. Com isso, é possível conhecer em qual período é mais favorável para ocorrer casos de LV, direcionando as medidas de prevenção e controle químico (Sousa et 2011, Elkhoury et al. 2018, Brasil 2014).

As medidas de controle da LV devem ser realizadas de forma integrada, tendo como objetivo diminuir as taxas de letalidade, como também o grau de morbidade e os níveis de transmissão da doença pelo vetor. No Brasil, as ações do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) são centradas no hospedeiro, por meio de inquéritos sorológicos de cães, utilizando-se da eutanásia quando são sorroreagentes positivos, como também, são direcionadas para educação em saúde, tratamento de casos humanos, manejo ambiental, e como medida de proteção individual para o principal reservatório coleiras impregnadas com deltametrina (Costa et al. 2020, Costa et al. 2018, Silva et al. 2027).

O componente educativo do programa de controle da LV tem base, envolver a população sobre “o que é”, “Quem transmite a LV”, “Como acontece a transmissão” “Como prevenir”, “E o que posso fazer” é um trabalho multiprofissional, que beneficia as comunidades das regiões atingidas, auxiliando assim no controle da doença (Costa et al. 2015).

O Ministério da Saúde (2014) recomenda que algumas atividades de educação e saúde sejam incluídas em todos os serviços que desenvolvem ações de controle dos vetores da LV, dentre elas:

- Informar a população sobre as manifestações clínicas, diagnóstico e tratamento da LV;
- Divulgar à comunidade informações sobre a ocorrência da doença na região;
- Capacitar profissionais e desenvolver atividades junto à comunidade, por meio de serviços de saúde e educação, disponibilizando materiais educativos, informando sobre a transmissão da doença e seus vetores, levando em consideração as condições de vida dos grupos locais.

Desse modo, a educação em saúde para o controle das leishmanioses é de suma importância, pois, quando a comunidade entende sobre locais de repouso dos vetores pode desenvolver meios mais adequados para criação de galinhas por exemplo, assim, a simples eliminação de todos os possíveis locais/criadouros de descanso dos flebotomíneos pela própria população, pode resultar numa redução significativa da incidência da doença (Kishore et al. 2006).

O manejo ambiental é direcionado para diminuir a presença e manutenção de criadouros de flebotomíneos, dificultando que o vetor se aproxime do homem e de cães domésticos. Utiliza de estratégias simples como: limpeza de quintais, terrenos e praças públicas, visando criar um ambiente inadequado para criadouros de formas imaturas. Limpeza urbana, eliminação e descarte adequado dos resíduos sólidos orgânicos, eliminação de fonte de umidade, cuidado com os animais domésticos, sempre que possível sua permanência fora do domicílio, entre outras, certamente contribuirão para evitar ou reduzir a proliferação do vetor (Brasil 2014).

Por fim, o método de controle químico constitui a principal linha de ação implementada pelo Ministério da Saúde, a qual constitui-se pela aplicação de produtos químicos no intra e peridomicílio das residências.

1.5.1 Controle químico

O uso de inseticidas de origem orgânica ou inorgânica é uma das formas mais utilizadas como larvicida e adulticida, fazendo parte do manejo sustentável e integrado para o controle de vetores em Saúde Pública (Braga, Valle 2007).

O controle químico compreende a utilização de substâncias químicas (inseticidas), sendo recomendada para o controle vetorial em âmbito de proteção coletiva, visando reduzir ou eliminar a presença de insetos transmissores de patógenos, reduzindo o contato entre o vetor e a população e conseqüentemente os casos de LV. No controle de flebotomíneos essa medida é focada para o adulto, uma vez que, formas imaturas desses insetos se tornam inviáveis para eliminação, devido à dificuldade de serem detectadas em criadouros naturais (Brasil 2014).

No Brasil, os produtos mais empregados para o controle químico no controle da LV são os inseticidas do grupo dos piretróides sintéticos, sendo eles, cipermetrina/alfacipermetrina e deltametrina. A borrifação é realizada em residências, preferencialmente em paredes internas e externas, incluindo o teto, quando a altura deste for de até 3 metros, como também em anexos, como abrigos de animais. A metodologia da aplicação, exige que o responsável realize a deposição uniforme de 40 mg de elemento ativo/m² construído, garantindo um efeito residual de três meses, com 2 ciclos de aplicação durante o ano (Elkhoury et al. 2018, Salomón et al. 2015, Brasil 2014).

Para o controle da LV, a borrifação residual é indicada em circunstâncias específicas, como (1) área com primeiro registro de caso humano ou canino, sendo realizado após a investigação entomológica; (2) residências num raio de 150 m do primeiro caso; (3) em áreas com transmissão moderada e alta onde a pulverização deve ser executada em residências em áreas pré-definidas antes e depois a estação chuvosa (Elkhoury et al. 2018).

Foi durante a segunda guerra mundial, que iniciou o desenvolvimento de inseticidas orgânicos sintéticos, a fim de proteger os soldados de insetos transmissores de doenças. O primeiro inseticida utilizado foi o DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano), que passou a ser usado com grande frequência contra mosquitos transmissores de malária. Foi nesse processo de busca de erradicação da malária, que ao mesmo tempo, teve um grande efeito sobre os flebotomíneos, ou seja, inseticida aplicado para vetores da malária em áreas peridomiciliares acabava indiretamente atingindo focos de flebotomíneos, resultando em uma diminuição da prevalência do vetor na Índia (Fontes, Zappen 2012, Lainson, Rangel 2005).

A primeira tentativa de controle de flebotomíneos usando inseticidas foi realizada com o organoclorados DDT, que aconteceu no Peru com a pulverização residual de duas cabanas com uma solução a 5% deste inseticida, demonstrando em um primeiro momento proteção contra *Lutzomyia verrucarum*. Esses pesticidas são bastante lipofílicos e altamente resistentes aos mecanismos de decomposição dos sistemas biológicos, o que faz com que permaneçam no meio ambiente, sendo os compostos mais persistentes já fabricado (Amora et al. 2009, Braga, Valle 2007).

As primeiras tentativas de controle químico de flebotomíneos, no Brasil, ocorreram durante a década de 1950, quando foi testado em residências a pulverização com uso do DDT, no estado do Rio de Janeiro. Posteriormente foi observado uma diminuição tanto nos níveis populacionais de flebotomíneos como nos casos de LV. Com isso, esse inseticida passou a ser

usado em campanhas contra *Lu. longipalpis* em outros estados brasileiros como Ceará e Minas Gerais até 1964, após seu início. Dessa maneira o emprego do DDT em campanhas de controle de flebotomíneos comprovou a eficácia deste inseticida reduzindo progressivamente a transmissão de leishmanioses, seu uso foi empregado no Brasil até 1992 (Torres, Sinval 2006, Alexandre, Maroli 2003, Teodoro, Galati, Kuhl 1998).

No entanto, medidas restritivas contra o uso de DDT foram tomadas pela primeira vez em 1971, pois, apresentava efeitos adversos como pouca degradação, persistindo por muito tempo no ambiente, gerando acúmulo em tecido do organismo de animais e de humanos, causando grandes mudanças ecológicas e problemas de saúde. Devido tais circunstâncias o DDT foi sendo gradativamente substituído pelos piretróides sintéticos, que são utilizados atualmente (Amora et al. 2009, Flores et al. 2004).

Os piretróides são caracterizados por serem biodegradáveis, não acumulativos e apresentarem baixa toxicidade para os mamíferos. Para os animais aquáticos, entretanto, são extremamente tóxicos (Braga; Valle, 2007, Rocha 2014). Os insetos quando tratados com piretróides apresentam um quadro de descoordenação e paralisia. Essas substâncias são neurotóxicas e agem sob a membrana dos neurônios afetando o mecanismo da bomba de sódio e potássio, impedindo a transmissão dos impulsos nervosos, levando o inseto a uma morte rápida (Heminhwhy 2004, Funasa 2001).

Falcão e colaboradores (1988) realizaram os primeiros trabalhos com piretróides, no estado de Minas Gerais, especificamente avaliando a eficácia de deltametrina para o controle da espécie *Lu. longipalpis*. Neste estudo, populações de *Lu. longipalpis* foram expostas a concentrações do inseticida, com isso, foi demonstrando eficácia deste piretróide.

Barata et al. (2011) em um estudo para avaliar a fauna de flebotomíneos após aplicação do piretróide cipermetrina, em Montes Claros/MG, foi observado que nas primeiras borrifações as espécies eram suscetíveis ao inseticida, demonstrando a redução de vetores em residências e anexos que

ocorreram a aplicação, sendo que a duração do efeito residual do inseticida foi de dois a quatro meses.

As estratégias de controle de flebotomíneos podem ser bastantes difíceis na prática, especialmente, quando associado a questões ambientais. Dessa forma, torna-se imprescindível compreender as interações entre a urbanização e a transmissão de doenças por vetores em meio social para que estratégias de prevenção e controle sejam adequadas. Além disso, é importante desenvolver de forma periódica o monitoramento da resistência a inseticidas.

No Brasil, as ações de controle sempre foram interrompidas por diversos motivos, como, falta de políticas públicas de saúde, problemas de financiamento e rotatividade de pessoas, limitações operacionais como a complexa metodologia de aplicação de inseticidas. Esses fatos corroboram para o surgimento de seleção de populações resistentes de flebotomíneos e conseqüentemente para reaparecimento de casos de LV em humanos e cães (Gontijo, Melo 2004). Por outro lado, novas tecnologias para o controle da transmissão da LV vêm surgindo ao longo do tempo, como por exemplo, o uso de coleiras impregnadas com inseticidas.

1.5.2 Coleiras impregnadas com deltametrina

Em meio urbano o principal reservatório relacionado LV tem sido cães domésticos. A partir disso, é notável que infecções em humanos vem precedidas de infecções em cães. Dessa forma, como medida preventiva coleiras impregnadas com inseticidas para o controle de LV vem sendo utilizada como medida de proteção individual para os cães (Figura 11). Essas coleiras contém um produto com função repelente e protegem o cão contra a picada de fêmeas de flebotomíneos, reduzindo dessa forma a interação vetor

hospedeiro, de certa forma reduzindo o ciclo de transmissão (Brasil 2021, Albuquerque et al. 2018, Alves et al. 2012).

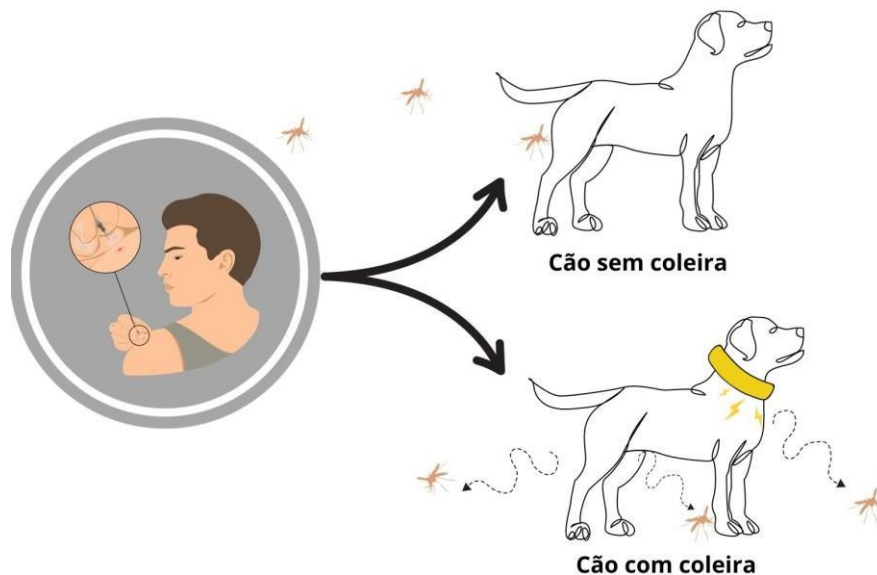


Figura 11. Repelência de flebotomíneos em cães encoleirados. Fonte: Elaborado pela autora.

No ano de 2010, o Ministério da Saúde (MS) buscando avaliar e fomentar novas ferramentas de controle para com a LV, financiou estudos voltados para a efetividade das coleiras impregnadas com o piretróide deltametrina a 4%, com mais de 300 mil cães encoleirados. Os resultados demonstraram que em áreas onde foram usadas as coleiras impregnadas com inseticidas houve redução de 52% de risco de infecção dos cães, em relação a áreas onde as coleiras não foram utilizadas (Brasil, 2021).

Além disso, pode-se avaliar que a coleira tinha melhor custo-efetividade quando comparada às ações já recomendadas pelo programa, como também foi de mais fácil aceitação pela população, quando comparada com a eutanásia de cães infectados, uma vez que o tratamento em animais não apresenta muita eficácia, pois os cães tratados e clinicamente curados muitas

vezes recidivam e permanecem infecciosos ao vetor flebotomíneo, além de apresentar custos muito elevados (Silva et al. 2018, Reithinger et al. 2003).

Diante disso, o MS recomendou a incorporação de coleiras impregnadas com inseticidas em vários municípios do Brasil, como uma estratégia adicional e complementar para às demais ações de controle previstas pelo PVC-LV (Diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral). Os municípios prioritários para adquirir as coleiras devem seguir critérios de risco de transmissão alta, intensa e muito intensa. A Tabela 2 resume critérios para a incorporação das coleiras impregnadas com inseticida fornecida pelo MS para os municípios brasileiros.

Tabela 2. Critérios para a incorporação das coleiras impregnadas com inseticida fornecida pelo MS para os municípios brasileiros.

Critérios para incorporação
<p>Municípios classificados com transmissão alta, intensa e muito intensa.</p> <p>Recursos humanos (Médico veterinário; controle de zoonoses responsável para monitoramento; Agentes de Combate à Endemia capacitados em coleta de sangue de cães).</p> <p style="text-align: center;">Recursos físicos/insumos.</p> <p style="text-align: center;">Estimativa da população canina do município.</p> <p>O estado e/ou município deve pactuar a atividade de incorporação das coleiras impregnadas com inseticida em instância colegiada do Sistema Único de Saúde.</p> <p>Divisão dos municípios em Áreas de Trabalho Local (ATL's)- Razão de cão por habitantes, prevalência canina e/ou vulnerabilidade socioeconômica.</p>
Após incorporação
<p>Com a adesão o município deverá manter a estratégia por, no mínimo quatro anos de trabalho nas áreas eleitas.</p> <p style="text-align: center;">Realização de oito ciclos de encoleiramento a cada 6 meses.</p> <p>Recomenda-se que as ATLS que irão utilizar a coleira como ferramenta de controle não realizem as atividades de controle químico.</p>
<p>Adaptado de Brasil (2021).</p>

David et al. (2001) testaram a eficácia das coleiras em relação a alimentação de fêmeas, quatro cães com coleiras de deltametrina e três cães com coleiras não tratadas (não impregnadas com deltametrina) foram mantidos em canis separados por mais de oito meses em Fortaleza, no Ceará. Periodicamente, um cão de cada grupo foi colocado em uma gaiola por 2 horas, na qual 150 fêmeas de *Lu. longipapis* foram liberadas 10-15 minutos. Os resultados demonstraram que de 2022 *Lu. longipapis* expostos em cães

com coleiras apenas 81 fêmeas estavam ingurgitadas, 83% dos 2.094 *Lu. longipalpis* recuperados dos cães contendo os cães sem coleiras estavam ingurgitados.

Dessa forma, estudos avaliativos como uso de coleiras caninas impregnadas com deltametrina 4%, têm demonstrado resultados satisfatórios. Kazimoto et al. (2017) também registraram redução na incidência de LVC com 53–59% em um estudo realizado Mossoró, Estado do Rio Grande do Norte, com *Lu. longipalpis* (81,8%) sendo a espécie mais abundante.

Silva et al. (2018) analisou o impacto do uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% (Scalibor) em populações de *Lu. longipalpis* em áreas com uso/não uso de coleiras, nos municípios de Fortaleza (CE) e Montes Claros (MG). Na área controle de Fortaleza foi capturado 415 exemplares e 159 na área de intervenção. Em Montes Claros, 5.660 exemplares capturados na área controle e 2.499 na área de intervenção. Com isso foi observado que em áreas de intervenção a presença do vetor *Lu. longipalpis* foi menor, demonstrando eficácia das coleiras em relação abundância do vetor.

Alves et al. (2020) avaliou a eficácia de coleiras impregnadas com deltametrina 4% (Scalibor) em duas áreas do município de Montes Claros (MG). Em uma área controle foram implementadas medidas preventivas preconizadas pelo Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (eutanásia de cães infectados e controle de vetorial). Na área de intervenção, coleiras impregnadas com deltametrina foram utilizadas em cães, além das outras medidas preventivas. No final do estudo, o uso de coleiras foi associado a uma redução significativa (aproximadamente 50%) na prevalência de casos caninos.

Neves et al. (2021) também avaliaram o efeito do emprego de coleiras impregnadas com deltametrina 4% (Scalibor) no controle da LVC no município de Andradina/SP. O uso de coleiras contribuiu para a redução da LVC com efetividade de 66%. Essa redução foi sustentada por um ano após a

descontinuação do uso da coleira e também foi observado uma sobrevivência na taxa canina de 90%.

Apesar da eficácia comprovada das coleiras em repelir flebotomíneos, Alves et al. (2012) descreveram, em Montes Claros/MG, as dificuldades operacionais na implementação das coleiras no município. Foi observado que de 4.388 cães soronegativos encoleirados, 36,9% não foram encontrados no segundo ciclo, 27% foram perdidos por sumiço/doação/venda e 22,6% porque a casa estava fechada e a perda de coleiras foi de 56,1% em um ano.

Nesta pesquisa, procuramos analisar os níveis de suscetibilidade de populações de campo da espécie *Lu. longipalpis* procedentes de áreas com uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4%, levando em consideração que flebotomíneos entram em contato com inseticida da coleira e, conseqüentemente podem contribuir para seleção de indivíduos resistentes em uma determinada população.

1.6 Resistência de flebotomíneos a inseticidas

Desde a década de 1940, os inseticidas químicos vêm sendo utilizados, tanto na agricultura e agropecuária quanto na área da Saúde Pública. A resistência a inseticidas continua a ser uma ameaça ao sucesso dos programas de controle de insetos vetores, devido principalmente ao uso continuado e indiscriminado dessas substâncias em diversas regiões do Brasil. A partir disso, a reemergência de doenças está envolvida diretamente a resistência, onde tem sido detectada para todas as classes de inseticidas, afetando, direta e profundamente muitas espécies de importância médica sanitária como mosquitos, triatomíneos, piolhos, pulgas e flebotomíneos (Derlinger et al. 2021, Derlinger et al. 2016).

Em 1990, foi relatado que mais de 500 espécies de artrópodes apresentavam resistência a inseticidas sintéticos, sendo 88% representantes

da Classe Insecta com quatro ordens (Diptera, Hemiptera, Coleoptera e Lepidoptera) e 12% eram da classe Arachnida, ordem Acarida (Ácaros e carrapatos). Embora quase todas as classes de insetos sejam atualmente afetadas pela resistência, a sua distribuição geográfica varia muito entre espécies (Denholm, Devine 2013).

A resistência refere-se à capacidade de uma população de insetos sobreviver a exposição de inseticidas que antes seria letal nessa mesma população. Compreende mudanças genéticas na suscetibilidade de uma população de insetos, que se reflete na falha repetida de um produto em atingir o nível de controle esperado quando usado de acordo com a recomendação do fabricante, resultando em indivíduos que são menos afetados pelo inseticida (IRAC 2021). A Figura 12 representa a evolução da resistência em uma população de insetos.

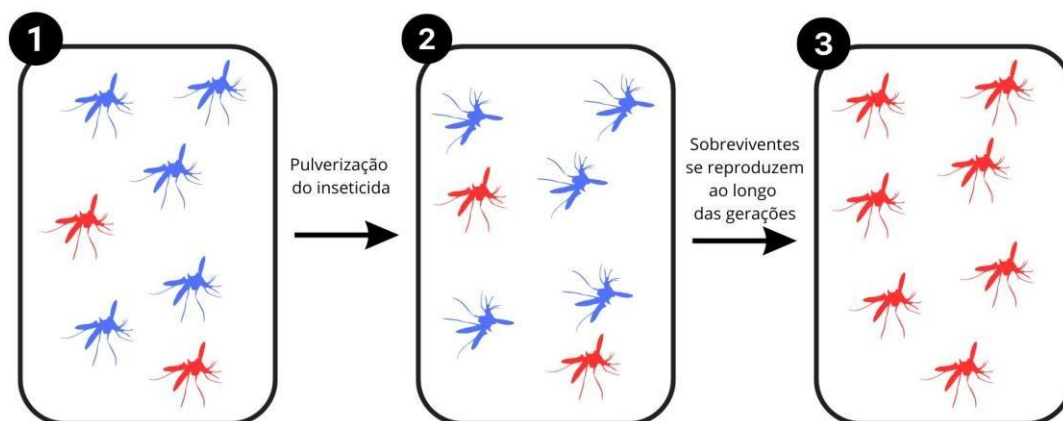


Figura 12. 1 - Insetos em vermelho, presença de alelo resistente. Insetos em azul, insetos sem alelos resistentes. 2 - Insetos com alelos resistentes sobrevivem, sem alelos resistentes morrem. 3 -População com alelos resistentes. Fonte: Elaborado pela autora.

A resistência é causada relativamente por pressão seletiva resultando em mudanças genéticas ao longo do tempo, podendo afetar as características fisiológicas ou comportamentais dos insetos. Fatores genéticos, operacionais

e bioecológicos podem contribuir para o surgimento de populações resistentes, tais como, natureza química do inseticida, falha de rotação de ingredientes ativos, calibração dos equipamentos de pulverização, exposição contínua e errônea de inseticidas, aplicação de doses mais elevadas, uso individual de inseticidas caseiros. Além disso, insetos que possuem ciclo de vida curto e prole abundante, contribuem para o surgimento de populações com diferentes características genéticas, aumentando a frequência de genes resistentes que são passados para próximas gerações (IRAC 2021, Moreira et al. 2012, Braga, Valle 2007, Hemingway, Ranson 2000).

Existem vários mecanismos pelas quais os insetos podem se tornar resistentes aos inseticidas, os mais comuns são: i) resistência comportamental, ii) resistência à penetração, iii) resistência metabólica e iv) resistência alterada no local-alvo.

A resistência comportamental é quando os insetos desenvolvem comportamentos diferentes fazendo com que não entre em contato com o inseticida, diminuindo a exposição. Este mecanismo de resistência foi relatado para diversas classes de inseticidas, incluindo organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. Dentre as mudanças comportamentais são incluídas, alterações no padrão de alimentação, seleção com menor aplicação do inseticida, mudanças de áreas (Siddiqui et al. 2023, Gan et al. 2021, Denholm, Devine 2013, Moreira et al. 2012, IRAC)

Resistência à penetração é quando ocorre uma mudança na cutícula externa dos insetos ficando mais espessa, fazendo que a absorção do inseticida seja mais lenta. A resistência à penetração ocorre quando os insetos retardam o envolvimento de xenobióticos em seus corpos. Essa resistência cuticular geralmente está envolvida na resistência cruzada a múltiplas classes de inseticidas (Siddiqui et al. 2023, Gan et al. 2021, Denholm, Devine 2013, Moreira et al. 2012, IRAC)

Resistência metabólica é um tipo de resistência onde os insetos metabolizam o inseticida mais rapidamente e transformando em formas menos tóxicas ou não tóxicas. Os insetos utilizam os seus sistemas enzimáticos para digerir seus compostos químicos e as populações

resistentes podem conter maior quantidade destas enzimas desintoxicantes. Essa elevada atividade enzimática deve-se a expressão maior de genes que codificam essas enzimas. Três enzimas, glutathione-S-transferases (GSTs), esterases (ESTs) e citocromo P450 (CYPs), estão envolvidas nesse processo de resistência nas principais classe de inseticidas (Siddiqui et al. 2023, Gan et al. 2021, Denholm, Devine 2013, Moreira et al. 2012, IRAC)

Resistência alterada no sitio-alvo é quando o local onde a toxina geralmente se liga no inseto é modificado para reduzir a efeitos do inseticida, ou seja, não tem interação do inseticida com seu sitio-alvo. Mutações de genes que codificam canais de sódio dependentes de voltagem são frequentemente observados em contextos de resistência a inseticidas, canal esse usado com ligação para piretróides (Siddiqui et al. 2023, Gan et al. 2021, Denholm, Devine 2013, Moreira et al. 2012, IRAC). A Figura 13 mostra os principais mecanismos de resistência.

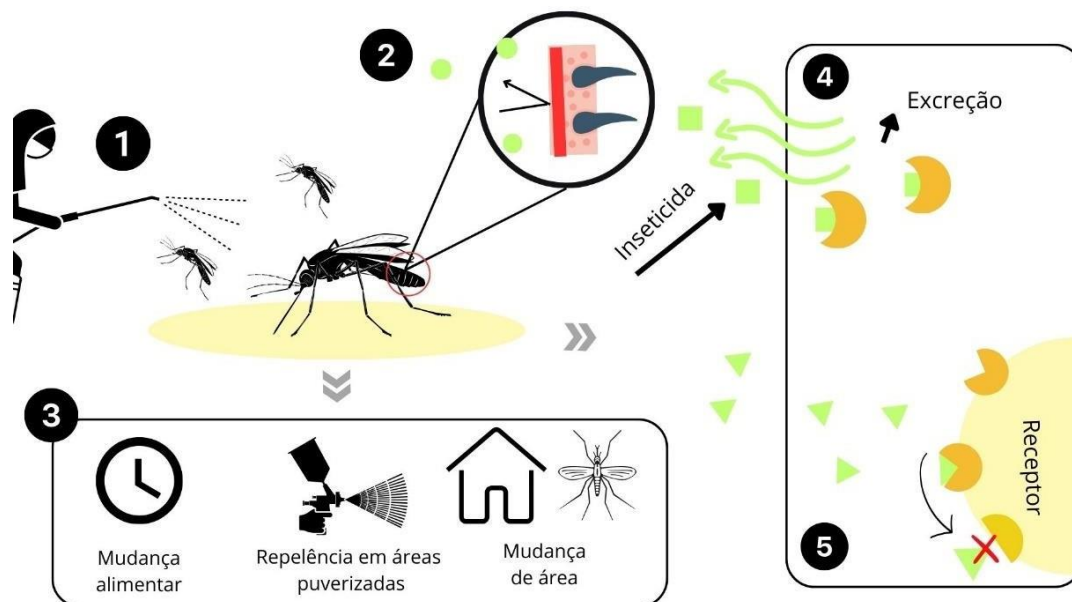


Figura 13. Principais mecanismos de resistência. 1- Exposição ao inseticida. 2- Resistência por penetração. 3- Resistência comportamental. 4-

Resistência metabólica. 5- Resistência sitio-alvo. Fonte: Elaborada pela autora.

Quando uma população de insetos desenvolve resistência a mais de um composto químico por meio de um único mecanismo é chamada resistência cruzada. Quando insetos expostos a um determinado inseticida e desenvolve vários mecanismos de resistência apresenta uma resistência múltipla (Toé et al. 2022, IRAC 2022).

A resistência a inseticidas poder ser detectada por meio de bioensaios biológicos, visando estabelecer a suscetibilidade/resistência de uma determinada população de vetores em relação as classes de inseticidas usadas em seu controle. Esses bioensaios consistem em sua maioria no uso de diferentes concentrações ou doses de inseticidas, expondo os vetores durante um intervalo de tempo determinado ou no efeito de uma única concentração durante períodos de tempo variáveis, tendo como finalidade estabelecer uma comparação com uma população de referência suscetível. O bioensaio pode ser usado em todas as fases evolutivas dos insetos, desde ovos a adultos. O bioensaio com garrafa do CDC é um método utilizado para determinar resistência em adultos, correspondem ao intervalo de tempo que um inseticida demora para penetrar em um artrópode, atravessar seus tecidos e chegar ao local alvo de ação e atuar neste, ou seja, quanto tempo o vetor leva para morrer (CDC 2010, Aragão 1972).

Dentre os bioensaios biológicos, é possível por meio de Dose-Resposta (DR) determinar o perfil de resistência em uma população. Esse método busca avaliar a resposta de uma população em relação a doses crescentes, usando aproximadamente entre 4 e 7 doses. Dados com DL_{50} (dose letal de inseticida que mata 50% de uma amostra da população em um determinado período de tempo) e DL_{95} (dose letal de inseticida que mata 95% de uma amostra da população em um determinado período de tempo) são obtidos com esse tipo de bioensaio, e com isso, pode-se determinar a Razão de

Resistência (RR), por meio das DLs. A RR fornece informações a respeito de quantas vezes a população investigada é mais resistente quando comparada a população suscetível ou de referência (Karunaratne et al. 2022, Burgess et al. 2020, Minho et al. 2016, Costa 2013).

A determinação de Dose Diagnóstica (DD) é outra forma de verificar resistência a classes de inseticidas. A DD é uma dose de inseticida por garrafa que mata 100% dos insetos suscetíveis dentro de um tempo específico. Para estimar a DD é necessário um bioensaio DR usando uma população suscetível, onde é exposta a concentrações diversas de inseticidas, sendo que a dose que provocou a morte de 100% dos insetos no menor tempo de leitura é considerada a DD. A DD é estabelecida por meio da DL_{99} multiplicada por 2, no caso de mosquitos (Campos et al. 2020, CDC 2010, Halliday, Burnham 1990).

Ademais, outros métodos para caracterizar resistência pode ser utilizado, como métodos bioquímicos, que objetiva encontrar alterações enzimáticas que estão envolvidas no processo de detoxificação de inseticidas em uma determinada população. Método de detecção de pontos de mutação, envolve o uso de RT-PCR, onde é comparada uma população suscetível e uma possível população resistente. Essa técnica ocorre por meio do sequenciamento de fragmentos genéticos dessas populações, podendo verificar a presença de mutações em genes que conferem resistência (Ribeiro et al. 2007).

Ainda com respeito à resistência em insetos de interesse sanitário, tem-se observado em várias áreas resistências comprovadas para várias espécies. Hayd et al. (2020) avaliou o status de suscetibilidade populações de *Aedes aegypti* ao piretróide deltametrina usando kits de tubo da OMS. Os quatro municípios de Roraima, onde os mosquitos foram coletados apresentaram resistência a deltametrina.

Outro estudo apresentou os resultados de avaliações de 146 municípios brasileiros amplamente dispersos pelo país, realizadas entre 1998 e 2012,

sobre o perfil de resistência de *Ae. aegypti* em relação ao temefós (organofosforados) e deltametrina. A grande maioria dos municípios mostraram resistência generalizada a ambos inseticidas (Valle et al. 2019). Campos et al. (2020) avaliaram o perfil de suscetibilidade de populações de *Ae. aegypti* ao malation (organofosforados) e piriproxifeno (Reguladores de Crescimento de Insetos). Esse estudo avaliou 132 municípios brasileiros, desse municípios seis populações dos Estados da Bahia e Ceará apresentam alterações de suscetibilidade ao piriproxifeno com Razões de Resistência (RR₉₅) variando de 1,51 a 3,58. Em relação ao malation, 73 populações distribuídas pelo país foram resistentes quando expostas ao DD local 20 µg/frasco.

O uso de mosquiteiros tratados com inseticidas é uma das principais ferramentas no controle da malária, no entanto, é observado rápido desenvolvimento e propagação da resistência aos inseticidas entre seus vetores. Um estudo realizado na África, com espécies *Anopheles gambiae* criados a partir de coleções de larvas foram expostas às doses de DDT, deltametrina e malation. Essas populações da espécie *An. gambiae* mostraram resistência a ambos inseticidas. Foram encontradas mutações no local alvo do DDT/piretróide, conhecidas como alelos de resistência knockdown (kdr), como alelos de resistência do gene da acetilcolinesterase, o sítio alvo de organofosforados (Edi et al. 2012, Yewhalaw et al. 2011). No Sudão foram relatados resultados semelhantes para *Anopheles arabiensis*, com inseticidas deltametrina e malation, apresentando altos níveis de resistência (Matambo et al. 2007).

Piccolo et al. (2005) realizou coleta de campo de *Triatoma infestans* no norte da Argentina buscando avaliar a suscetibilidade desse vetor frente os inseticidas deltametrina e cipermetrina. Todas as populações de campo exibiram altos graus de resistência em comparação com a cepa suscetível em relação a ambos inseticidas.

Culex quinquefasciatus - vetor do vírus do Nilo Ocidental, também apresentou resistência a organofosforados, carbamatos e DDT. A presença de mutações em *kdr* relacionadas à resistência a piretróides foi relatada para populações brasileiras de *Cx. quinquefasciatus* (Lopes et al. 2019, Longo 2016).

O primeiro registro de resistência em flebotomíneos foi feito em relação à espécie *Phlebotomus papatasi*, em 1978, na Índia. Quando essa espécie foi exposta ao DDT observou-se que 80% flebotomíneos permaneceram vivos após uma hora de exposição (Rocha et al. 2021). Na Índia, populações de campo de *Phlebotomus argentipes* foram expostas aos inseticidas DDT e malation, onde algumas populações registraram um perfil de resistência ao DDT e malation (Singh & Kumar 2015).

Na Venezuela, uma população de campo de *Lu. longipalpis* capturada em área endêmica para LV foi testada quanto a sua suscetibilidade aos inseticidas malation e deltametrina. No entanto, os níveis de resistência observados foram baixos para ambos inseticidas (Mazzari et al. 1997). No Peru, Vargas et al. (2006) encontrou resultados semelhantes para o inseticida deltametrina em populações de *Lutzomyia peruensis*.

No Brasil, Rocha et al. (2020) analisou o perfil de suscetibilidade de quatro populações de *Lu. longipalpis* ao inseticida alfa-cipermetrina expostas a 5 diferentes concentrações. Os resultados demonstraram suscetibilidade dessas populações ao piretróide alfa-cipermetrina.

Por outro lado, Alexandre et al. (2009) demonstrou a baixa suscetibilidade de *Lu. longipalpis* para os piretróides deltametrina e permetrina. Duas populações brasileiras, procedentes de Montes Claros/MG e Lapinha/MG foram usadas neste estudo, sendo essa última considerada como referência. Esse estudo demonstrou o primeiro registro de tolerância de *Lu. longipalpis* a inseticidas na América do Sul.

Denlinger et al. (2021) observou a suscetibilidade em laboratório de *Lu. longipalpis* e *Ph. papatasi* a 10 inseticidas que foram usados no controle de

vetores por meio de bioensaios de garrafa CDC. Foi demonstrado que *Lu. longipalpis* e *Ph. papatasi* são suscetíveis aos carbamatos bendiocarb e propoxur e ao organofosforado fenitrothion, porém, ambas espécies são menos suscetíveis ao DDT.

O uso de inseticidas químicos é a principal estratégia de controle de vetores em programas de saúde, sendo que a resistência é relatada para todas as classes de inseticidas e para grande maioria dos vetores. Dessa forma, monitorar sistematicamente os níveis de resistência e empregar medidas de segurança na aplicação de inseticidas é de fundamental importância dentro do cenário de controle de vetores.

2 JUSTIFICATIVA

O controle da Leishmaniose Visceral em ambientes urbanos e periurbanos é direcionada para a diminuição da densidade do vetor, por meio da aplicação de inseticidas químicos, como alfacipermetrina. Devido à falta de uma vacina segura e eficiente para combater a LV, assim como a baixa adesão ao tratamento e diversos efeitos colaterais causados pelos antimonial pentavalentes, a eliminação do vetor é a melhor forma de interromper a transmissão humana, nas áreas endêmicas.

Com o aumento contínuo dos casos de leishmanioses e um histórico de controle químico específico de mais de 60 anos, o monitoramento da suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, principalmente em áreas com uso de coleiras impregnadas, torna-se fundamental para aprimorar as ações de controle vetorial, tendo em vista que essa tecnologia de controle utiliza piretróide, por exemplo, deltametrina. Portanto, pode existir a sobreposição de produtos como alfacipermetrina (borrifação residual), juntamente com deltametrina (coleiras), ademais, a aplicação de inseticida para controle de mosquitos *Aedes aegypti* e *Anopheles* spp., por exemplo, pode atingir, simultaneamente focos pontuais de *Lu. longipalpis* em determinadas áreas. Assim, tais situações, podem selecionar populações resistentes a inseticidas, elevando dessa forma o nível de exposição de *Lu. longipalpis* a inseticidas.

Ressalta-se que as informações a respeito da ocorrência de resistência em áreas com uso de coleiras em espécies do gênero *Lutzomyia* são escassas e quase inexistentes, principalmente no Brasil. Ainda, não se tem nenhum conhecimento amplo e bem fundamentado sobre o potencial de resistência frente a exposição de coleiras impregnadas com o piretróide deltametrina.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil de suscetibilidade de diferentes populações de *Lutzomyia longipalpis* ao piretróide deltametrina em áreas com uso de coleiras impregnadas para controle de LV.

3.2 Objetivos específicos

- Coletar e identificar populações de flebotomíneos procedentes de municípios com uso de coleiras impregnadas;
- Determinar a Dose Diagnóstica a partir de uma linhagem de referência de suscetibilidade procedente do insetário da Fiocruz/RJ;
- Estimar o perfil de suscetibilidade/resistência de seis populações de flebotomíneos expostos a deltametrina;
- Estabelecer a Razão de Resistência de seis populações de flebotomíneos coletadas em municípios com uso de coleiras impregnadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População de referência

Foi utilizado flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, procedentes de Jacobina (Bahia) e criados no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz) do Rio de Janeiro. Trata-se de uma colônia mantida em insetário desde 1970, sem aporte de material externo. Os insetos são mantidos em condições semi-controladas de temperatura e umidade ($28 \pm 2^\circ\text{C}$ e $65 \pm 10\%$ UR), com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro.

4.2 Flebotomíneos de campo

Os flebotomíneos foram capturados nos municípios de Foz do Iguaçu/PR (S 25° 32' 49" W 54° 35' 18"), Fortaleza/CE (S 3° 43' 6" W 38° 32' 36"), Caucaíia/CE (S 3° 44' 4" W 38° 39' 23"), Teresina/PI (S 5° 5' 21" W 42° 48' 6"), Montes Claros /MG (S 16° 44' 13" W 43° 51' 53") e Cavalcante/GO (S 13° 47' 51" W 47° 27' 20") conforme mostra Figura 14. Os pontos de coleta de cada município estão detalhados no Apêndice I.

Os municípios foram selecionados conforme os seguintes critérios: i) elevada transmissão de LV; ii) uso de coleiras impregnadas a longo prazo; iii) realização de um programa específico de controle de LV e iv) casas com presença de cães com LV.

As coletas ocorreram por meio de armadilhas luminosas do tipo HP e/ou CDC, as quais foram instaladas no peridomicílio das residências durante três noites consecutivas (17:00 às 08:00), conforme mostram as Figuras 15 e 16.

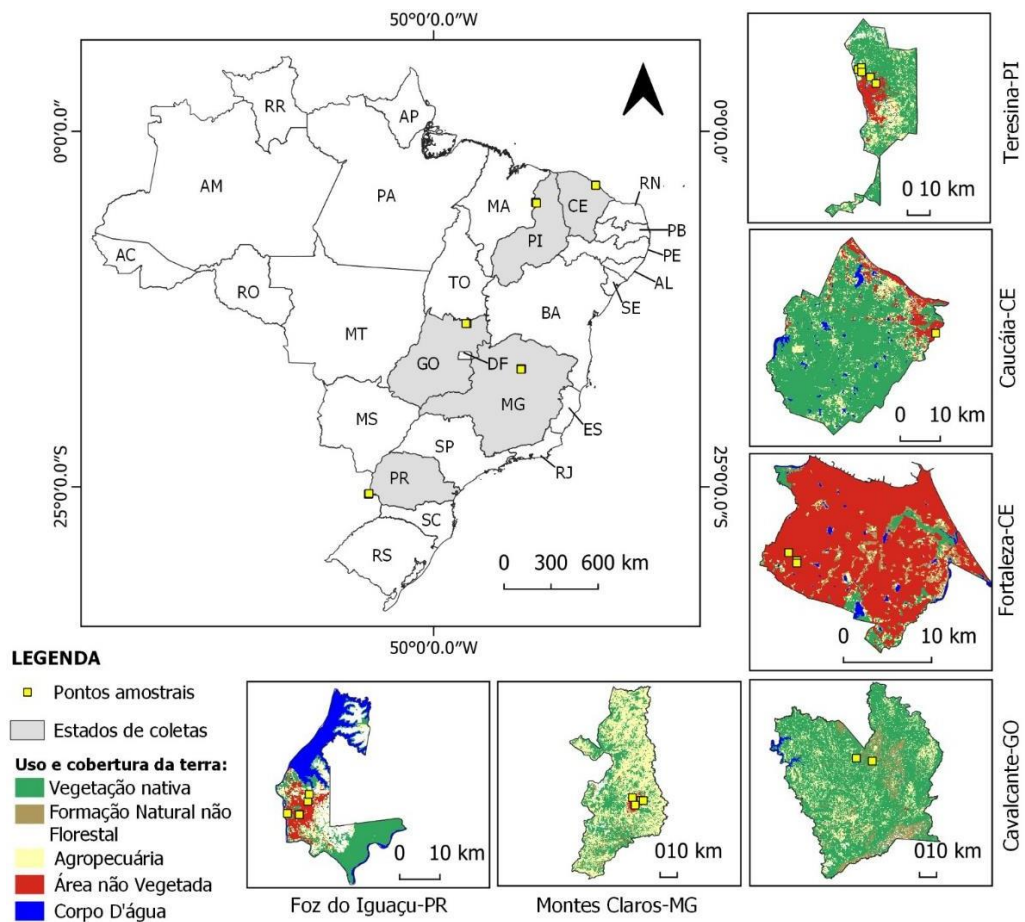


Figura 14. Mapa do Brasil mostrando os estados (cinza) e os municípios onde foram realizadas as coletas e bioensaios com garrafas do CDC para avaliação de suscetibilidade de *Lu. longipalpis* expostos ao inseticida deltametrina, em 2023. Fonte: MapBiomias (2023).

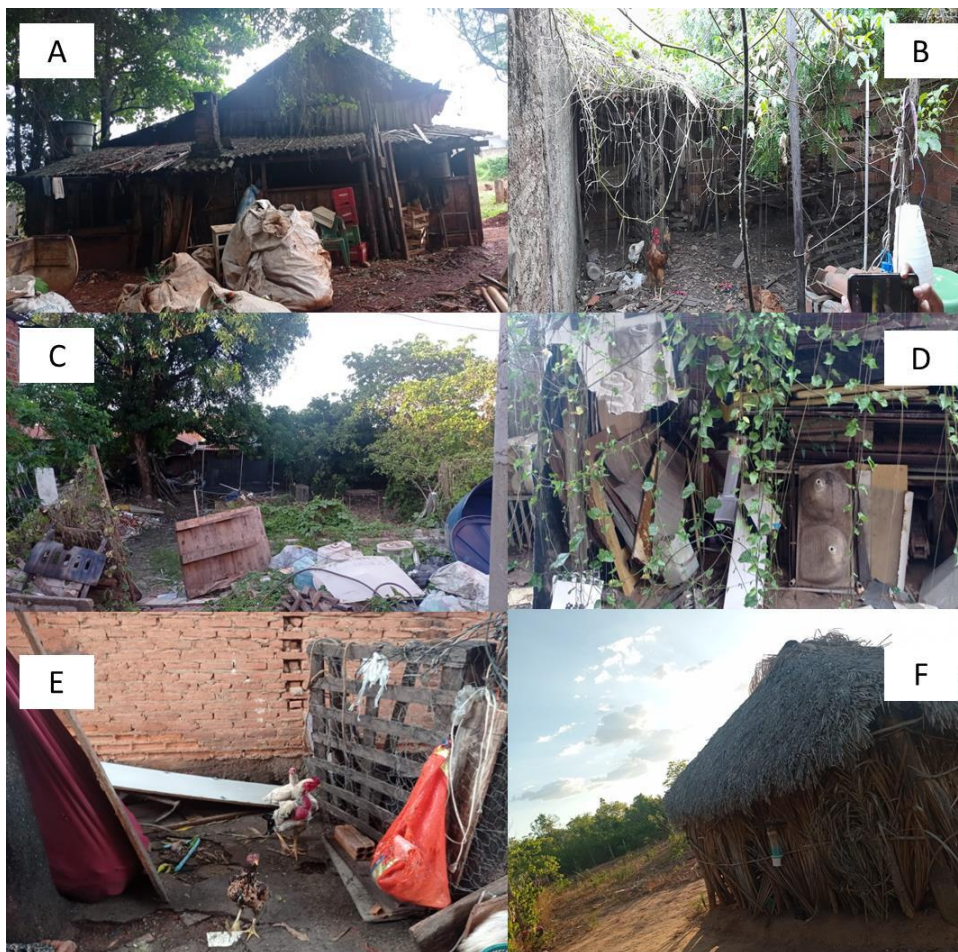


Figura 15. Áreas de coleta de *Lu. longipalpis* mostrando os diferentes ambientes de ocorrência nos seguintes estados: A) Foz do Iguaçu/PR; B) Fortaleza/CE; C) Caucaia/CE; D) Teresina/PI; E) Montes Claros/MG; F) Cavalcante/GO.



Figura 16. Armadilhas luminosas utilizadas para captura de flebotomíneos. (A) Armadilha tipo CDC. (B) Armadilha tipo HP com gaiola modificada.

No dia seguinte, as armadilhas eram recolhidas durante o período da manhã e os flebotomíneos foram transportados em caixas de poliestireno (isopor) contendo papel toalha umedecida. Nos laboratórios de entomologia municipais, as armadilhas eram separadas em positivas e negativas para presença de flebotomíneos. Por fim, os flebotomíneos coletados na armadilha tipo CDC foram transferidos para gaiolas entomológicas maiores (30 x 30 cm), proporcionando maior espaço de armazenamento, conseqüentemente aumentando o conforto das espécies. Após isso, foram mantidos no escuro por meio de um tecido preto que cobria a gaiola. Esse procedimento foi realizado para aclimatização dos insetos por uma hora até a realização dos bioensaios biológicos.

4.3 Impregnação das Garrafas

O inseticida utilizado nos bioensaios foi o piretróide deltametrina ($C_{22}H_{19}Br_2NO_3$) da BAYER, com grau de pureza de 99.6%. Foi pesado um total de 10,1 mg de inseticida grau técnico (em pó), o qual foi diluído em 1 ml de acetona (PA-Dinâmica) para preparação da solução mãe. Após isso, uma segunda solução foi preparada, a partir da solução mãe com uma concentração 0,5 mg/ml. Em seguida, foram preparadas as subdoses de 1,3,5,7,9,11 $\mu\text{g/garrafa}$ para os experimentos Dose-Resposta (DR). Além disso, as garrafas também foram impregnadas com as doses de 21,9 $\mu\text{g/garrafa}$ e 30 $\mu\text{g/garrafa}$ para bioensaios Doses Diagnóstica (DD). A Dose Diagnóstica de 30 $\mu\text{g/garrafa}$ foi preconizada por Delinger et al. (2016) para populações de *Lu. longipalpis* ao piretróide deltametrina. Essa dose foi determinada a partir de uma colônia de referência do Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR) e os bioensaios foram realizados na Universidade Estadual de Utah, localizada nos Estados Unidos. Frascos de vidro de 250 ml (Wheaton) foram impregnadas com 1 ml de deltametrina e os frascos controles com 1ml de acetona (Figura 17A), identificados por nome do inseticida, concentração e data do teste. Todos os frascos foram impregnados uniformemente nas partes laterais, superior e inferior por meio de rotação do recipiente e observação criteriosa da impregnação (Figura 17B). Após impregnação a tampa foi retirada dos frascos para evitar condensação e as garrafas permaneceram destampadas para evaporação da acetona por um período de uma hora (Figura 17C). Após a secagem de todos os frascos foram tampados e armazenados em caixas plásticas (29 litros) cobertas por um tecido preto para proteção da luz.

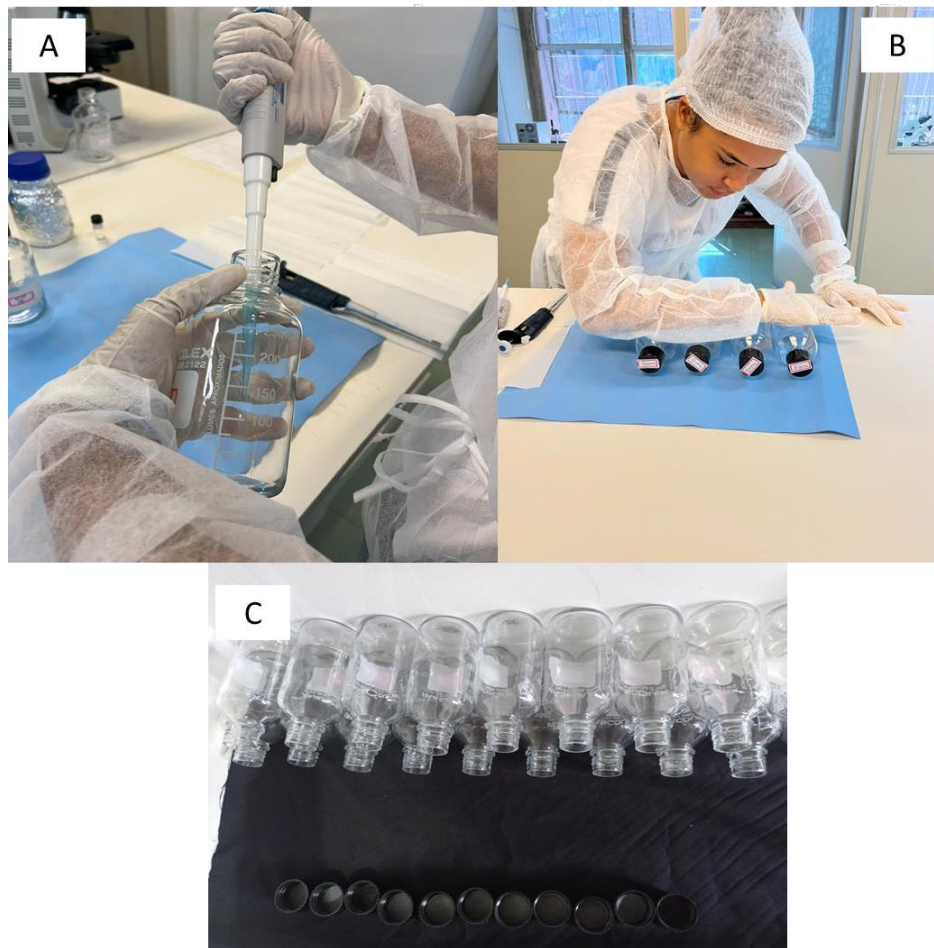


Figura 17. Processo de impregnação das garrafas do CDC com as diferentes doses de deltametrina. (A) 1 ml de inseticida sendo adicionado aos frascos. (B) Garrafas sendo impregnadas lateralmente. (C) Procedimento de secagem das garrafas por meio da evaporação de acetona PA.

4.4 Bioensaios de garrafas DD

Para o estudo foi utilizada a metodologia de bioensaios com garrafa do CDC, descrita pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2022b), com pequenas modificações. Para os experimentos de DD foram usadas as doses

de 21,9 e 30 µg/garrafa, sendo que para cada garrafa foram expostos cerca de 20 flebotomíneos (♂♂ e ♀♀ misturados), provenientes do campo, as quais foram retirados das gaiolas com auxílio de um capturador de Castro (Figura 18A).

Em seguida, os flebotomíneos eram introduzidos em cada garrafa com auxílio de um capturador de Castro e um funil pequeno registrando-se o minuto zero até completar 60 minutos de exposição (Figura 18B). Primeiramente, foram introduzidos os flebotomíneos nas garrafas controle, as quais eram rapidamente fechadas e posicionadas horizontalmente. Para inserção dos flebotomíneos no grupo controle foi utilizado um capturador de Castro e um funil em separado para evitar contaminação das garrafas. A seguir, os flebotomíneos eram inseridos nas garrafas impregnadas com as DDs. Nesta parte, foram usados um total de 15 garrafas, sendo 3 garrafas para o grupo controle, conforme mostra a Figura 18C. As garrafas do grupo controle foram impregnadas somente com acetona.

Para cada garrafa era registrado o tempo inicial e a mortalidade foi avaliada a cada 10 minutos, sendo que os flebotomíneos mortos e vivos foram anotados na Ficha de Bioensaios com Garrafas do CDC, conforme Apêndice II. Todas as garrafas permaneciam cobertas com um pano preto para evitar o mínimo contato com a luz e eram descobertas, apenas para leitura de mortalidade. A leitura de mortalidade foi realizada após 24h. Foram realizados três bioensaios em diferentes dias.



Figura 18. Experimentos de suscetibilidade com garrafas do CDC. (A) Retirada dos flebotomíneos das gaiolas. (B) Introdução dos flebotomíneos nas garrafas com auxílio de capturadores de Castro. (C) Bioensaio de garrafas do CDC mostrando um experimento de DD.

4.5 Bioensaios de garrafas DR

Os bioensaios de DR também foram realizados com as populações de campo, seguindo os mesmos procedimentos descritos acima. Nesta etapa, foram utilizadas um total de 21 garrafas, sendo três garrafas para cada concentração (1,3,5,7,9 e 11 $\mu\text{g/garrafa}$), totalizando 18 garrafas e 3 controles. O grupo controle foi utilizado apenas acetona. Para cada dose foram expostos, aproximadamente 20 flebotomíneos (♂♂ e ♀♀ misturados). Após a introdução dos flebotomíneos no grupo controle e nas garrafas impregnadas com as diferentes doses foi registrado o tempo inicial e a cada 10 minutos foram contabilizados os insetos mortos e vivos.

Após isso, os flebotomíneos foram transferidos para potes plásticos de 250 ml com tela de proteção com algodão contendo solução açucarada a 10%. A leitura de mortalidade foi realizada em 24 horas por único pesquisador

(Figura 19 A, B e C). Após a leitura os flebotomíneos foram armazenados em Eppendorf contendo álcool isopropílico para serem conservados até o momento da identificação em nível de espécie. Cada Eppendorf era identificado por dia do teste e município.

Os flebotomíneos foram transportados para o Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília para identificação taxonômica. Machos e fêmeas foram montados e clarificados, segundo Forattini (1973) e identificados utilizando a chave de Galati (2015) e o aplicativo Lutzodex (Rocha et al. 2019). A abreviação dos gêneros seguiu a proposta de Marcondes (2007).



Figura 19. Transferência dos flebotomíneos após 60 minutos de exposição. (A) Parafilm sendo utilizado no lugar da tampa. (B) Capturador envolto por parafilm para retirada dos flebotomíneos do frasco. (C) Flebotomíneos sendo transferidos para potes de plásticos com auxílio de capturador de

4.6 Critérios de mortalidade

Os flebotomíneos foram considerados mortos conforme critérios descritos por Rocha et al. (2023): i) incapacidade de voar de forma coordenada; quando imóvel; ii) não conseguiam ficar de pé; iii) poderiam ficar de pé e voar brevemente, mas caíam imediatamente.

Os critérios para avaliação de resistência foram obtidos de WHO (2022b) de acordo com: i) mortalidade de $\geq 98\%$ indica suscetibilidade; ii) mortalidade $\geq 90\%$ mas $< 98\%$ sugere possibilidade de resistência e iii) mortalidade menor que 90% sugere resistência estabelecida/confirmada.

Com as DL_{50} e DL_{95} estimadas para cada população foi calculada a RR_{50} e RR_{95} (Razão de Resistência). A resistência foi determinada de acordo com Mazzarri & Georghiou (1995) em resistência baixa, moderada ou alta para $RR < 5$, entre $5,0-10,0$ e $> 10,0$, respectivamente.

4.6 Análise estatística

A taxa de mortalidade foi calculada somando o número de flebotomíneos mortos em todos os testes, expressos em porcentagem:

$$Mortalidade (\%) = \frac{\text{Número de insetos mortos}}{\text{Número total de insetos}}$$

Os dados de mortalidade das populações de *Lu. longipalpis* foram utilizados para estimar a concentração que mata 50% (DL_{50}) e 95% (DL_{95}) e 99% (DL_{99}) das amostras estudadas. O cálculo da DL_{50} , DL_{95} e DL_{99} de cada população foi baseado na análise Probit (Lichfield & Wilcoxon 1949) e foi realizado pelo programa *Basic Probit Analysis* e Polo Plus (LeOra Software, 2002-2023). As doses letais foram expressas em microgramas por garrafa

($\mu\text{g/garrafa}$). Também foi estimado o coeficiente angular da curva dose resposta (slope) por meio do programa GraphPad Prism versão 5.0 (Graph Pad Software, Boston, Massachusetts, USA). O slope representa a homogeneidade da população, indicando a progressão de resistência e variação genotípica na tolerância a um inseticida. De forma geral, os menores valores do coeficiente angular da curva indicam populações mais heterogêneas, conseqüentemente com maior probabilidade de seleção de resistência. As Razões de Resistência (RR) 50 e 95 foram obtidas por meio do quociente da $DL_{50/95}$ da população de campo pela $DL_{50/95}$ da linhagem suscetível. Quanto maior a Razão de Resistência, maior a magnitude da resistência da população ao inseticida.

5 RESULTADOS

5.1 Flebotomíneos expostos em garrafas do CDC

Cerca de 4.094 flebotomíneos foram utilizados para os bioensaios de suscetibilidade com de garrafas do CDC. A ocorrência da espécie *Lu. longipalpis* pode ser observada na Tabela 3. *Lu. longipalpis* foi a espécie de maior ocorrência, a qual foi coletada em todos os municípios com 3.843 exemplares, representando 94%, seguidas por *Migonemyia migonei* (0,8%), *Evandromyia lenti* (0,6%), *Evandromyia sallesi* (0,3%) e *Nyssomyia whitmani* (0,1%).

Devido problemas na clarificação e montagem, 173 espécies de flebotomíneos utilizados nos bioensaios não foram identificados, em nível de espécie. Deste total, 16 foram procedentes de Foz do Iguaçu/PR, 20 de Teresina/PI, 75 de Caucaía/CE, 3 de Montes Claros/MG, 30 de Fortaleza/CE e 21 de Cavalcante/GO.

Tabela 3. Distribuição das espécies de flebotomíneos coletadas por meio de armadilhas luminosas em áreas com uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4%, conforme sexo, estado e município de coleta, em 2023.

Espécies	Estados e Municípios												Total (%)
	Paraná		Piauí		Ceará				Minas Gerais		Goiás		
	Foz do Iguaçu		Teresina		Fortaleza		Caucáia		Montes Claros		Cavalcante		
	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	546	79	548	69	443	282	375	143	460	118	585	195	3.843 (94)
<i>Migonemyia migonei</i>	0	0	0	0	14	0	16	2	0	0	0	0	32 (0,7)
<i>Evandromyia lenti</i>	0	0	2	6	0	0	6	4	5	1	0	0	24 (0,5)
<i>Evandromyia sallesi</i>	0	7	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	15 (0,3)
<i>Nyssomyia whitmani</i>	3	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	7 (0,1)
Sem identificação	0	16	0	20	0	38	0	75	0	3	0	21	173 (4,2)
Total	549	102	553	96	457	320	397	224	465	130	585	216	4.094 (100)

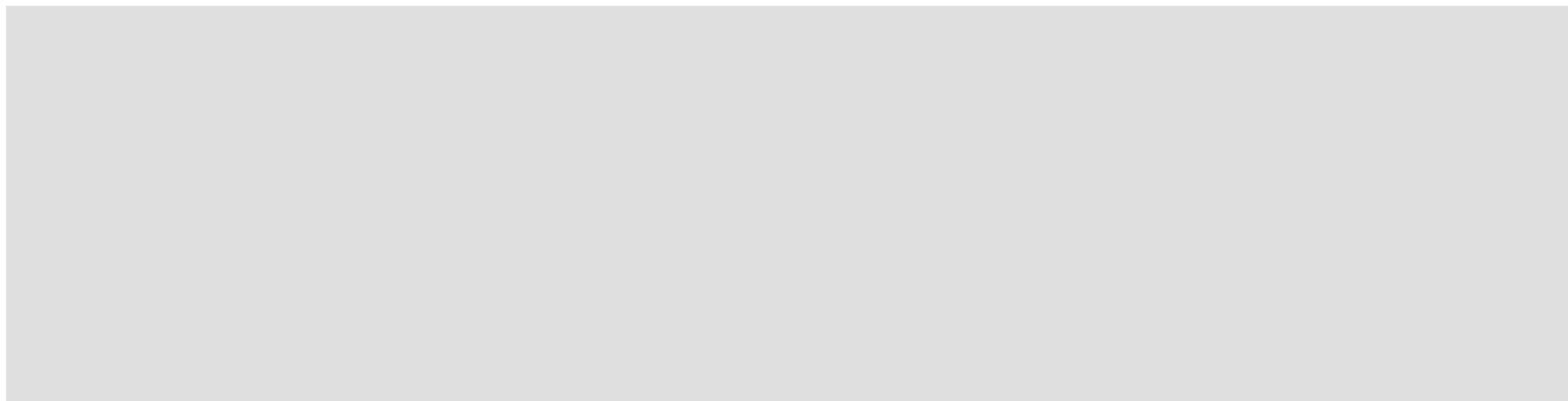
5.2 Bioensaios com utilização de DD

A DL₉₉ para população de referência de *Lu. longipalpis* foi 21,9 µg/garrafa e o tempo letal foi de 60 minutos de exposição para a dose de 11 µg/garrafa, a qual atingiu 100% de mortalidade. Para os experimentos de DD adotamos o valor de 1xDL₉₉.

Bioensaios de garrafas do CDC impregnadas com DD de 21,9 µg/garrafa permitiram a exposição de 1.196 flebotomíneos coletados em seis áreas com utilização de coleiras impregnadas para controle da LV. A maioria das populações de *Lu. longipalpis* procedentes dos municípios de Foz do Iguaçu/PR, Montes Claros/MG, Cavalcante/GO e Teresina/PI foram suscetíveis a deltametrina com taxa de mortalidade de 98,2%, 95,7%, 99,2% e 99,5%, respectivamente (Tabela 4). No entanto, a população de flebotomíneos oriunda de Caucaia/CE apresentou mortalidade de 87,1%, sugerindo resistência a deltametrina e a população de Fortaleza/CE demonstrou um valor de 94,9% de mortalidade quando expostos a deltametrina em bioensaios de garrafa, ou seja, possível resistência.

Para a DD de 30 µg/garrafa, cerca de 1.124 flebotomíneos foram expostos aos bioensaios de garrafas do CDC. As populações de flebotomíneos oriundas de Caucaia/CE e Teresina/PI apresentaram mortalidade de 95,5% e 95,8%, respectivamente. Esses valores sugerem possibilidade de resistência a deltametrina. Além disso, a população de Fortaleza/CE demonstrou um valor de 99,9% de mortalidade quando expostos a deltametrina. A população de Foz do Iguaçu/PR apresentou mortalidade de 98,7%. Dessa forma, ambas populações são suscetíveis. As populações de Montes Claros/MG e Cavalcante/GO também demonstraram suscetibilidade a deltametrina, com valores de taxa de mortalidade de 99,3% e 99,6%, respectivamente. Os dados apresentados podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 4. Taxa de mortalidade de populações de flebotomíneos expostos a DD de 21 µg/garrafa de deltametrina em bioensaios de garrafas do CDC, em 2023.



* Caucáia/CAU. Fortaleza/FOR. Foz do Iguaçu/FOZ. Montes Claros/MOC. Cavalcante/CAV. Teresina/ TER.

Tabela 5. Taxa de mortalidade de populações de flebotomíneos expostos a DD de 30 µg/garrafa de deltametrina em bioensaios de garrafas do CDC, em 2023.

Mortalidade (%) após exposição com deltametrina (30 µg/garrafa) Tempo									
de exposição (min)									
População	N	10	20	30	40	50	60	24hrs	Classificação
CAU	173	4,1	16,2	41,6	64,7	82,1	95,5	95,3	Possível resistência
TER	191	9,9	35,1	68,5	89,5	95,8	97,9	95,8	Possível resistência
FOZ	160	6,2	17,5	46,5	77,5	95,1	95,1	98,7	Suscetível
MOC	153	19,6	44,4	98,1	99,3	99,9	100	99,3	Suscetível
CAV	226	24,7	75,6	97,7	100	100	100	99,6	Suscetível
FOR	221	9,9	19,9	37,5	50,2	68,7	78,7	99,9	Suscetível

* Caucáia/CAU. Fortaleza/FOR. Foz do Iguaçu/FOZ. Montes Claros/MOC. Cavalcante/CAV. Teresina/ TER.

5.3 Perfil de suscetibilidade de populações de campo de *Lu. longipalpis*

Lu. longipalpis procedente do município de Teresina/PI apresentou a menor mortalidade, cujo valor foi de 6,38%, na dose de 1 µg/garrafa. Por outro lado, as populações de Montes Claros/MG e Cavalcante/GO registraram maior taxa de mortalidade com valores de 18,6% e 16,8%, respectivamente. (Tabela 6).

Para a dose de 3 µg/garrafa a população de *Lu. longipalpis* oriunda de Cavalcante/GO apresentou a maior mortalidade (81,3%), quando comparada as demais populações, seguida de Montes Claros com 60,3%. As populações procedentes de Foz do Iguaçu/PR, Fortaleza/CE, Caucaíia/CE e Teresina/PI obtiveram taxa de mortalidade entre 20 e 30%.

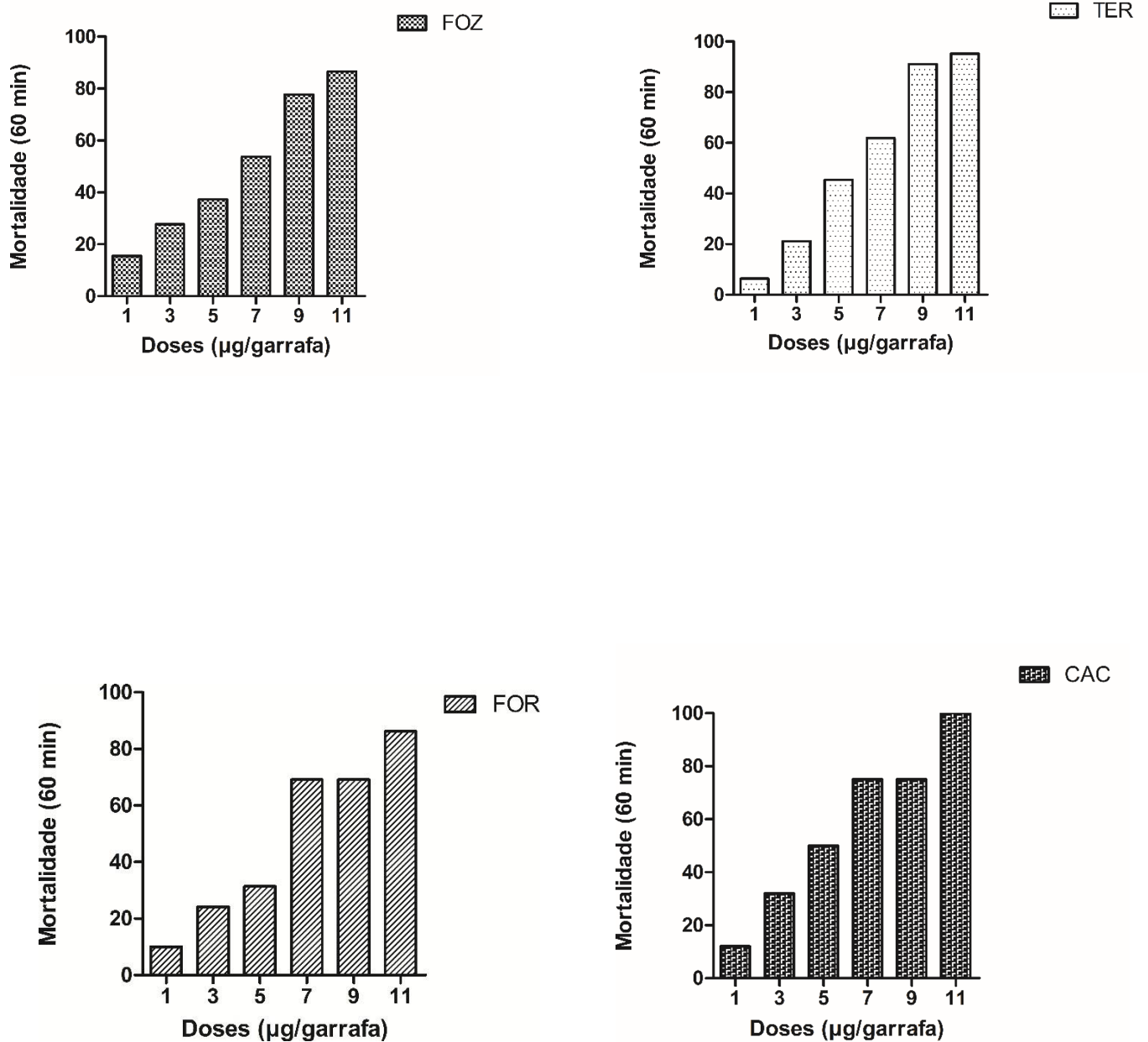
A dose de 5 µg/garrafa atingiu mortalidade de 100% para a população de *Lu. longipalpis* coletada no município de Cavalcante/GO. Esse nível de mortalidade se manteve nas doses seguintes, demonstrando elevada suscetibilidade desta população a deltametrina. *Lu. longipalpis* de Montes Claros/MG obteve a segunda maior mortalidade para essa dose com 86,6%, enquanto que as demais populações variaram de 30 a 40% de mortalidade

Registrou-se maior mortalidade (93,6%) para *Lu. longipalpis* procedente de Montes Claros/MG na dose de 7 µg/garrafa. Foz do Iguaçu/PR e Caucaíia/CE mantiveram uma média de 50% de mortalidade, enquanto que, Fortaleza/CE e Teresina/PI foram superiores a 60%.

Na dose de 9 µg/garrafa foi possível observar que a população de *Lu. longipalpis* coletada em Teresina/PI apresentou mortalidade superior a 90% e com Montes Claros/MG chegando a 100%. As populações de Fortaleza/CE, Caucaíia/CE e Foz do Iguaçu//PR apresentaram uma taxa de mortalidade entre variando entre 60 e 70%.

As populações de *Lu. longipalpis* de Cavalcante/GO e Montes Claros/MG atingiram 100% de mortalidade no tempo de 60 minutos, ou seja, estão muito próximas aos níveis de mortalidade da população suscetível (LRS) para a dose de 11 µg/garrafa. Porém, as populações de Foz do

Iguaçu/PR, Fortaleza/CE, Caucaia/CE e Teresina/PI, apresentaram taxa de mortalidade entre 86,5% a 96,2%. Todos esses resultados podem ser observados na Figura 20.



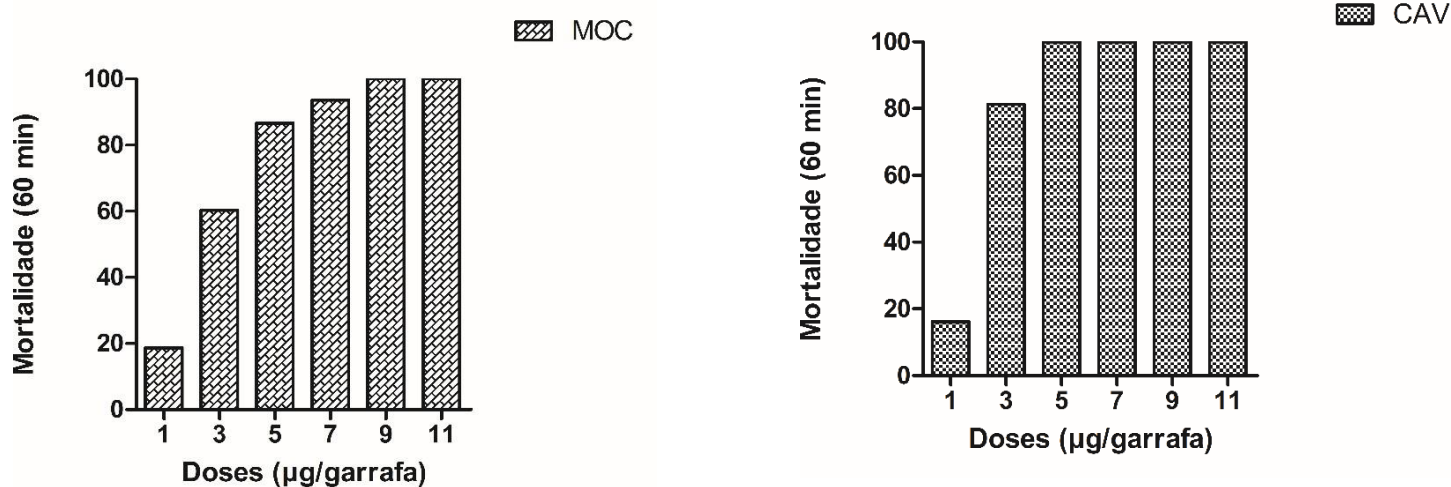


Figura 20. Média de mortalidade para doses respostas ao piretróide deltametrina com 60 min de exposição. (FOZ) População de Foz do Iguaçu/PR. (FOR) População de Fortaleza/CE. (CAU) População de Caucaia/CE. (TER) População de Teresina/PI. (MOC) Montes Claros/MG. (CAV) Cavalcante/GO.

A DL_{50} da população de referência foi de 3,50 µg/garrafa. As DL_{50} das populações de campo variaram entre 9,53 a 1,92 µg/garrafa. A população de *Lu. longipalpis* procedente de Caucaia/CE apresentou o maior valor de DL_{50} com 9,53 µg/garrafa, enquanto que a população de Cavalcante/GO obteve o menor valor que foi de 1,92 µg/garrafa. Nota-se que este valor foi menor que da LRS mencionada acima. As populações de *Lu. longipalpis* de Foz do Iguaçu/PR e Caucaia/CE apresentaram diferenças significativas na DL_{50} quando comparadas com a população de referência (LRS), quando os limites de confiança foram sobrepostos ao nível de 95%, conforme mostra a Tabela 6.

A DL_{95} da população de referência foi de 12,8 µg/garrafa e a variação das DL_{95} das populações de campo foram de 53,6 a 4,33 µg/garrafa. As populações de *Lu. longipalpis* procedentes de Caucaia/CE e Fortaleza/CE obtiveram os maiores valores de DL_{95} com 53,6 µg/garrafa e 17,5 µg/garrafa,

respectivamente. Observou-se que a população de Cavalcante/GO registrou o menor valor com 4,33 µg/garrafa, seguida de Montes Claros/MG (7,83) (Tabela 6). Não foi observada diferenças significativas na DL₉₅ das populações de campo, quando os limites de confiança foram sobrepostos ao nível de 95%.

Os valores de RR₅₀ apresentaram uma variação entre 2,27 a 0,54, demonstrando baixos níveis de resistência para as populações analisadas. *Lu. longipalpis* procedente de Caucaia/CE apresentou maior valor com 2,27 µg/garrafa. A RR₅₀ da população de Foz do Iguaçu/PR foi de 2,03 µg/garrafa, seguida da população de Fortaleza/CE com um valor de 1,77. A população de Teresina/PI mostrou um valor de 1,54 µg/garrafa. Cavalcante/GO e Montes Claros/MG obtiveram os menores valores, com 0,54 µg/garrafa e 0,76 µg/garrafa, respectivamente.

Os menores valores de RR₉₅ foram para as populações de Cavalcante/GO e Montes Claros/MG, com 0,33 e 0,61, respectivamente. *Lu. longipalpis* de Caucaia/CE apontou o maior valor de 4,18 µg/garrafa, seguida de Fortaleza/CE com 1,36 µg/garrafa. Para população de Foz do Iguaçu foi observado valor de 1,21. Teresina/PI teve sua RR₉₅ estimada em 0,92 µg/garrafa. Esses valores podem ser observados na Tabela 6.

Os valores do coeficiente angular das populações de flebotomíneos dos municípios de Teresina/PI (TER) e Caucaia/CE (CAU), mostrados nas Figuras 21, quando comparados à população de referência, apontaram menor homogeneidade e maior frequência de indivíduos com alelos de resistência, os quais podem ser selecionados futuramente, mediante forte pressão de inseticidas químicos. Por outro lado, *Lu. longipalpis* procedente de Foz do Iguaçu, mostrados na Figura 21, demonstraram padrões de coeficiente angular similares a população de referência.

O coeficiente angular da população de *Lu. longipalpis* procedente de Cavalcante/GO apresentou perfil semelhante a população de referência (Figura 22). Populações de *Lu. longipalpis* procedentes de Fortaleza/CE e Montes Claros/MG possuem maior heterogeneidade, em relação a população

de referência, portanto, sugerindo possibilidade de seleção de indivíduos resistentes, caso haja pressão de inseticidas.

Tabela 6. Distribuição da população, número de exemplares por amostra, Slope, DL₅₀, DL₉₅, RR₅₀ e RR₉₅ de populações de *Lu. longipalpis* expostas ao piretróide deltametrina em bioensaios de garrafa do CDC, em 2023.

Estado	População	n	Slope	DL₅₀ (IC 95%)	DL₉₅ (IC 95%)	RR₅₀	RR₉₅
Bahia	LRS	420	2,93	3,50 (1,38-5,73)	12,8 (7,29-128,2)	-	-
Ceará	Caucáia	247	2,19	9,53 (7,09-36,1)	53,6 (20,9 -50,1)	2,27	4,18
Paraná	Foz do Iguaçu	325	4,86	7,12 (6,36-7,81)	15,5 (12,9-21,3)	2,03	1,21
Ceará	Fortaleza	337	3,64	6,21(4,75-8,03)	17,5 (9,59-36,2)	1,77	1,36
Piauí	Teresina	258	4,75	5,39 (4,73-5,98)	11,9 (10,2-15,4)	1,54	0,92
Minas Gerais	Montes Claros	279	3,53	2,67 (2,04-3,18)	7,80 (6,18-11,8)	0,76	0,61
Goiás	Cavalcante	328	4,66	1,92 (1,53-2,27)	4,33 (3,57-5,78)	0,54	0,33

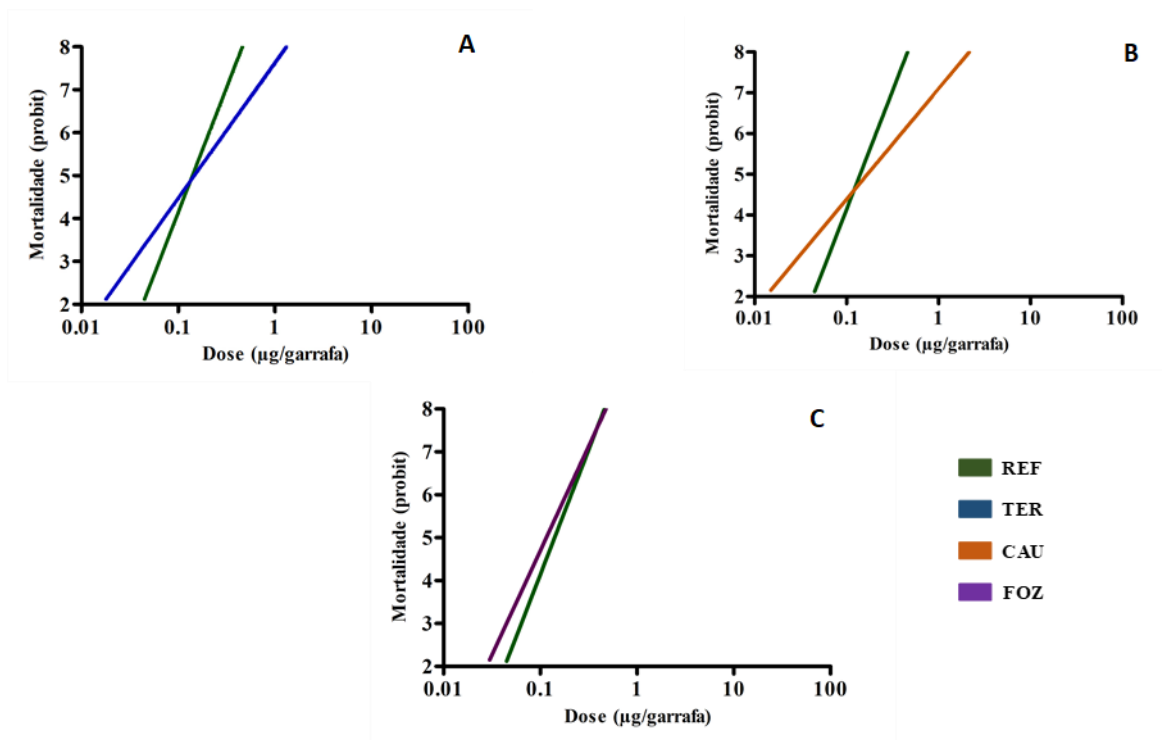


FIGURA 21. Curva de mortalidade de populações de *Lu. longipalpis*, em escala logarítmica, para o inseticida deltametrina. A: comparação entre REF (5,81) e TER (3,15), B: comparação entre REF (5,81) e CAU (2,70), C: comparação entre REF (5,81) e FOZ (4,86).

REF: população de referência, TER: Teresina/PI, CAU: Caucaia/CE, FOZ: Foz do Iguaçu/PR.

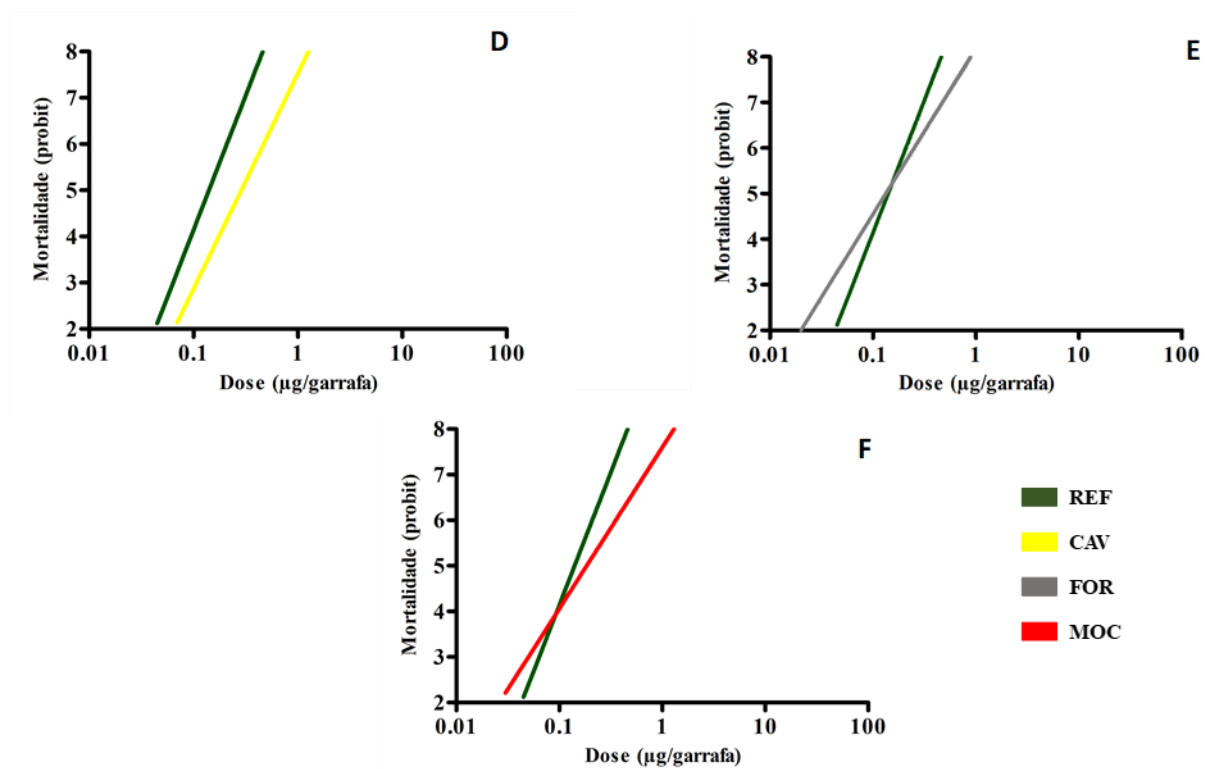


FIGURA 22 . Curva de mortalidade de populações de *Lu. longipalpis*, em escala logarítmica, para o inseticida deltametrina. A: comparação entre REF (5,81) e CAV (4,66), B: comparação entre REF (5,81) e FOR (3,64), C: comparação entre REF (5,81) e MOC (3,53).

REF: população de referência, CAV: Cavalcante/GO, FOR: Fortaleza/CE, MOC: Montes Claros/MG.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo estimou o perfil de suscetibilidade de seis populações de flebotomíneos coletados em áreas com uso de coleiras caninas para o controle da LV. A espécie de maior ocorrência em todos os municípios foi *Lu. longipalpis*, representando 94% (3.843), seguidas por *Migonemyia migonei* com 0,7% (32), *Evandromyia lenti* com 0,5% (24), *Evandromyia sallesi* com 15 (0,3%) e *Nyssomyia whitmani* com 7 (0,1%). Esses resultados corroboram com Rocha et al. (2020) que ao estudarem a suscetibilidade de *Lu. longipalpis* ao inseticida alfacipermetrina coletaram, em quatro municípios dos estados de Minas Gerais e Goiás, 88% de *Lu. longipalpis*, seguidas de *Lu. ischnacantha* (6%), *Lu. renei* (3%), *Nyssomyia whitmani* (1%), *Evandromyia lenti* (0.8%), *Micropygomyia villelai* (0.6%), *Ev. (Barrettomyia) série Cortelezzii* (0.2%), *Ev. bacula* (0.2%) e *Brumptomyia avellari* (0.2%).

Lu. longipalpis expostos na DD de 21,9 µg/garrafa de deltametrina demonstrou elevada suscetibilidade para populações oriundas de Foz do Iguaçu/PR, Montes Claros/MG, Cavalcante/GO e Teresina/PI. Porém, para população de Caucaia/CE registra-se resistência e Fortaleza/CE sugere-se uma classificação de possível resistência, conforme critérios estabelecidos por WHO (2022).

Para a DD de 30 µg/garrafa, as populações de *Lu. longipalpis* procedente de Caucaia/CE e Teresina/PI apresentaram-se com possibilidade de resistência ao piretróide deltametrina, enquanto que Foz do Iguaçu/PR, Montes Claros/MG, Cavalcante/GO e Fortaleza/CE apresentaram mortalidade acima de 98%, ou seja, suscetíveis a deltametrina, quando expostos em garrafas do CDC. Singh et al. (2012) avaliaram o perfil de suscetibilidade do principal vetor da LV na Índia *Ph. argentipes*. Essa espécie foi suscetível para malation e deltametrina com mortalidade entre 98 e 100% e 98,4 e 100%, respectivamente. Zahra et al. (2021) também constataram mortalidade de

100% para *Ph. papatasi* para deltametrina e malation expostos em tubo da OMS.

A dose de 30 µg/garrafa foi preconizada por Delinger et al. (2016), a partir de colônia de *Lu. longipalpis* criada no Walter Reed Army Institute of Research, sendo testada pela primeira vez em populações de campo no presente trabalho.

Nesse estudo, a DD proposta por Derlinger et al. (2016) permitiu discriminar a população de *Lu. longipalpis* procedentes de Caucaia/CE como possível resistência. Roy et al. (2022) apontaram possibilidade de resistência para deltametrina em populações de *Ph. argentipes* coletadas nas localidades de Bishanpur, Madhepura e Pokhariya, no Nepal. A taxa de mortalidade variou entre 95,4% a 97,9% e a intensidade da resistência foi baixa, porém com recomendação de uso de inseticidas com diferentes modos de ação, tais como organofosforados ou novos produtos pré qualificados pela OMS.

Nesta pesquisa, a DD foi de 21,9 µg/garrafa para LRS procedente da FIOCRUZ/RJ. Marceló et al. (2014), na Colômbia, determinaram a DD para *Lu. longipalpis* por meio de bioensaios de garrafa dos CDC. Esses pesquisadores utilizaram a DD de 10 µg/garrafa para deltametrina. Também na Colômbia, Santamaria et al. (2003) estimaram uma DD de 10 µg/garrafa para uma população de *Lu. longipalpis* criada em laboratório, expostas por 60 minutos. Portanto, destaca-se a importância de utilizar uma DD estimada a partir de uma população de referência local, conforme preconizada por Campos et al (2017).

Chaubey et al. (2023) também destacaram que *Phlebotomus argentipes* apresenta diferentes DD, de acordo com cada localidade e tipo de inseticida estudado. Após 24 horas de exposição aos inseticidas alfacipermetrina, deltametrina, malation e DDT apresentaram as DDs de 2 µg/garrafa, 2 µg/garrafa, 1 µg/garrafa e 25 µg/garrafa, respectivamente.

Observa-se que após 60 minutos de exposição, na DD 30 µg/garrafa, apenas as populações de Montes Claros/MG e Cavalcante/GO atingiram mortalidade de 100%. Ressalta-se que, desde a concentração de 3 µg/garrafa até a maior que foi de 11 µg/garrafa, ocorreu grande mortalidade para ambas

populações de campo, principalmente Cavalcante/GO que aos 30 minutos de exposição já apresentava mortalidade de 100% para as doses de 5, 7, 9 e 11 µg/garrafa, diferentemente da LRS que obteve 100% de mortalidade, apenas na dose de 11 µg/garrafa, após 60 minutos de exposição.

Os municípios de Montes Claros/MG e Cavalcante/GO tiveram menor pressão de inseticida, pois as coleiras foram implantadas em 05/2023 e 08/2023, respectivamente. O quantitativo de cães encoleirados foi de 419 em Montes Claros/MG e 359 em Cavalcante/GO. Dessa forma, a população de *Lu. longipalpis* coletada em Cavalcante/GO apresentou pouco tempo de exposição a inseticidas e foi coletada em ambiente mais preservado, pois localiza-se em área preservada da comunidade Kalunga do estado do Goiás (Figura 14). Tal fato, pode explicar a maior suscetibilidade desta população, podendo ser utilizada até como LRS para futuros estudos de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas.

Por outro lado, a implantação das coleiras impregnadas no município de Caucaia/CE iniciou-se em 04/2022, com um total de 675 cães encoleirados em dois ciclos. Fortaleza implantou as coleiras em 07/2021, com um quantitativo de 122.467 cães utilizando coleiras. Esses dois municípios apresentaram menor taxa de mortalidade para espécie *Lu. longipalpis*. Esse fato, pode ter influenciado os resultados obtidos, uma vez que possuem maior tempo de pressão de inseticidas, tanto pelo uso das coleiras, quanto pelo tratamento residual, as quais utilizam inseticidas piretróides.

Nota-se que a população de *Lu. longipalpis* oriunda de Caucaia/CE foi classificada como resistente e possível resistente, quando exposta as DDs de 21,9 e 30 µg/garrafa, respectivamente. Ressalta-se que alguns pontos devem ser mencionados para interpretação desses resultados: i) fêmeas alimentadas de *Lu. longipalpis* apresentam maior mortalidade para alfacipemetrina em comparação com fêmeas não alimentadas (Rocha et al. 2023) e ii) o tempo de armazenamento das garrafas influencia a persistência do ingrediente ativo (Perea et al. 2009). Nesta pesquisa não houve a separação de fêmeas alimentadas das não alimentadas durante os bioensaios de garrafa do CDC e as garrafas permaneceram armazenadas por um período de 13 dias,

excepcionalmente para os bioensaios com a população de Caucaia/CE. Dessa forma, duas hipóteses poderiam explicar este resultado. A primeira é a maior quantidade de fêmeas ingurgitadas e a segunda seria a perda da efetividade do ingrediente ativo, pois no terceiro dia de bioensaio, observou-se menor mortalidade entre os flebotomíneos expostos em todos os frascos.

Para mosquitos da espécie *Ae. aegypti* as garrafas impregnadas com cipermetrina podem ser utilizadas de 3 a 4 vezes, após 24 horas de armazenamento. Quando armazenadas no escuro e em temperatura ambiente perdem sua efetividade após o 14º dia, sendo necessária teste de efetividade para conduzir novos experimentos (Perea et al. 2009; Rodriguez et al. 2017). Futuros estudos tornam-se necessários para analisar a persistência de inseticidas em garrafas do CDC para estudos de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas.

De um modo geral, todas as populações demonstraram baixos níveis de resistência quando comparadas com a LRS, pois as RR_{50} variaram de 2,27 (Caucaia/CE) a 0,54 (Cavalcante/GO). A RR_{50} e RR_{95} da população de *Lu. longipalpis* procedente de Caucaia/CE foi a maior de todas as populações analisadas (2,27) e (4,18), porém considerada baixa, de acordo com Mazzarri & Georghiou (1995).

Os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram com Bidabadi et al. (2022) que estimaram RR_{50} de 2,52 para a geração F1 da espécie *Phlebotomus papatasi* em experimentos de suscetibilidade com tubos da OMS. As espécies foram suscetíveis para quatro inseticidas da classe dos piretróides.

Mazzari et al. (1997) encontraram menor suscetibilidade de *Lu. longipalpis* coletados em campo para DDT e malation, quando comparados com a LRS e as RR_{50} foram para deltametrina e permetrina apresentaram valores de 1,47 e 1,19, respectivamente. Com isso, foi observado para essa população de *Lu. longipalpis* baixos níveis de resistência para ambos inseticidas.

Maroli et al. (2002) estimaram a RR_{50} de duas espécies de flebotomíneos - *Phlebotomus perniciosus* e *P. papatasi*. Os bioensaios com kits da OMS durante 60 minutos detectaram valores de RR_{50} para DDT, lambdacialotrina e permetrina de 1,19, 0,65 e 0,88 para *Ph. perniciosus* e 1,08, 1,51 e 1,41 para *P. papatasi*, respectivamente. Essas espécies foram suscetíveis aos inseticidas testados, em comparação com a população de referência.

Mazzarri & Georghiou (1995) classificaram os níveis de resistência para mosquitos como baixa, moderada ou altamente resistente, conforme $RR_{95} < 5$; entre 5 e 10,0; e > 10 . Os mosquitos apresentam fisiologia, comportamentos e tamanhos diferentes, quando comparados aos flebotomíneos. Assim, torna-se necessário definir com maior precisão os pontos de corte da RR para os flebotomíneos, pois não existe uma padronização dessas informações na literatura. Estudos com diversas populações de *Lu. longipalpis* de laboratório e de campo, realizados simultaneamente, poderiam auxiliar na padronização (Pessoa et al. 2015).

Um ponto importante é a padronização de uma LRS. *Lu. longipalpis* procedente da Gruta da Lapinha/MG foi sugerida como LRS em estudos de suscetibilidade com piretróides (Alexander et al. 2009, Pessoa et al. 2015). Neste estudo, sugerimos a população de *Lu. longipalpis* procedente de Cavalcante, como potencial LRS, uma vez que apresentou mortalidade de 100% na dose de 5 µg/garrafa e $DL_{50}=1,92$ e $DL_{95}=4,95$, ou seja, menor que a colônia utilizada neste estudo, com $DL_{50}=3,50$ e $DL_{95}=12,8$.

Organização Pan-Americana da Saúde (2005) sugere que o SRL deve:

- i) apresentar pelo menos mais de cinco gerações criadas em condições de laboratório sem contato com inseticidas;
- ii) não ter novos insetos adicionados à colônia durante as últimas cinco gerações;
- iii) a população não deve ter tido contato com inseticidas e
- iv) mostrar suscetibilidade a inseticidas em campo na linha do tempo confirmada em bioensaios laboratoriais.

Normalmente, populações criadas e mantidas em colônia possuem dietas sanguíneas oferecidas com maior frequência e regularidade, melhores condições de abrigo e proteção e pouca influência da temperatura e humidade. Esses fatores podem explicar a maior tolerância a inseticidas de populações de colônia, em relação a populações de campo. Outro fator que poderia explicar a maior mortalidade nas populações de campo seria que durante a captura e transporte as amostras poderiam sofrer danos físicos ou estresse que aumentariam sua mortalidade (Rocha et al. 2021).

Gonzales et al. (2019) avaliaram o efeito a longo prazo da exposição de uma população de *Lu. longipalpis* aos inseticidas deltametrina (0,5%) e lambda-cialotrina (0,05%), durante um período de 30 meses no município Araçatuba, São Paulo, Brasil. Casas selecionadas no município foram randomizadas para receber um de três métodos de exposição a inseticidas: i) cães que receberam coleiras com 1g de deltametrina; ii) galinheiros pulverizados com lambda-cialotrina e iii) casas com grupo controle sem tratamento com inseticidas. *Lu. longipalpis* foi submetido a bioensaios com papel impregnado e demonstraram taxa de mortalidade 100% aos 60 minutos de exposição para ambos os inseticidas. Ademais, *Lu. longipalpis* de laboratório foi mais tolerante a deltametrina e lambdacialotrina, em comparação com as populações coletados em campo.

O slope permite inferências sobre o nível de variabilidade genética de uma determinada população, indicando uma progressão da resistência. Populações com pouco variabilidade genética possuem reduzidas chances de modificar sua RR, enquanto que as populações com maior variabilidade genéticas apresentam maiores chances de alterar sua RR, em relação ao inseticida utilizados ao longo do tempo (Obara et al. 2011).

As populações de Teresina/PI, Caucaia/CE, Montes Claros/MG e Fortaleza/CE, quando comparadas com a LRS, apresentaram uma maior heterogeneidade, ou seja, maior probabilidade de seleção de indivíduos

resistentes. Por outro lado, *Lu. longipalpis* procedente de Cavalcante/GO foi a população com maior homogeneidade.

A seguir, destacam-se algumas limitações deste trabalho: i) dificuldade de coletas em áreas vulneráveis e de difícil acesso; ii) quantidade insuficiente de flebotomíneos para realização dos bioensaios; iii) perda de amostra durante o processo de identificação e iv) inexistência de uma colônia de *Lu. longipalpis* na Universidade de Brasília.

Em Fortaleza, as áreas de coleta eram localizadas em periferias/favelas, as quais eram controladas por facções criminosas e durante as coletas somente um técnico de entomologia vinculado à Secretaria Estadual de Saúde do Ceará obteve autorização para entrada no bairro Bom Jardim – área selecionada para este estudo. No município de Cavalcante, os locais de coleta localizavam-se em comunidade Kalunga e para chegar ao destino percorria-se grandes distâncias de estradas de terra somente com veículos apropriados (4x4).

Muitas vezes, eram necessários a instalação de armadilhas cedidas pelos núcleos de entomologia locais para elevar o esforço de captura, uma vez que nas casas selecionadas por este projeto, o quantitativo de flebotomíneos coletados não permitiam a condução dos experimentos, com no mínimo 20 flebotomíneos por garrafa.

Somente após a exposição ao inseticida a espécie pode ser corretamente identificada. A identificação depende da preparação e montagem de espécimes mortos, seguido de visualização detalhada das estruturas taxonômicas localizadas externamente e internamente. As espécies que não foram identificadas, algumas sofreram danos como perda do abdômen e cabeça durante a clarificação, como também algumas amostras continham muitos ovos e após a clarificação seu abdômen ficou bastante escurecido impossibilitando a identificação.

Por fim, há necessidade de padronização do tempo de armazenamento das garrafas, uma vez que os protocolos existentes não trazem este tipo de

informação. A resposta para esta pergunta poderia ser dada, caso existisse uma colônia de *Lu. longipalpis* na Universidade de Brasília.

7 CONCLUSÃO

- *Lu. longipalpis* representou 94% das espécies de flebotomíneos coletadas de campo, validando a proposta do protocolo da OMS (2022a) que recomenda o monitoramento de resistência diretamente com populações de campo, devido à alta variação interlaboratorial nas estimativas de mortalidade de população de colônia;

- As DDs de 21,9 e 30 µg/garrafa comprovaram que as populações de *Lu. longipalpis* procedentes de Caucaia e Fortaleza, ambos no estado do Ceará apresentam-se com resistência e possível resistência. O monitoramento de resistência de flebotomíneos deve ser realizado periodicamente ao longo do tempo, a fim de mapear a distribuição espacial da resistência para novas áreas e/ou populações.

- A intensidade de resistência foi baixa para todas as populações, quando comparadas com a LRS. A padronização de uma LRS de *Lu. longipalpis* torna-se fundamental para futuros estudos com suscetibilidade de flebotomíneos aos inseticidas utilizados no seu controle.

- A população de Cavalcante/GO apresentou um perfil de suscetibilidade maior que a própria população de referência, podendo ser enquadrada como uma LRS.

- As populações de *Lu. longipalpis* procedentes de Teresina/PI, Fortaleza/CE, Caucaia/CE e Montes Claros/MG são mais heterogêneas, portanto, possuem maior tendência para a seleção de resistência. No entanto, *Lu. longipalpis* é um complexo de espécies crípticas e estudos moleculares devem ser realizados para determinar diferenças genéticas dessas populações e como elas afetam a tolerância de diferentes classes de inseticidas.

8 REFERÊNCIAS

Alexander B, Barros VC, de Souza SF, Barros SS, Teodoro LP, Soares ZR, Gontijo NF, Reithinger R. Susceptibility to chemical insecticides of two Brazilian populations of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Trop Med Int Health. 2009;14(10):1272-1277.

Alves F, Bilbe G, Blesson S, Goyal V, Monnerat S, Mowbray C, Muthoni Ouattara G, Pécoul B, Rijal S, Rode J, Solomos A, Strub-Wourgaft N, Wasunna M, Wells S, Zijlstra EE, Arana B, Alvar J. Recent Development of Visceral Leishmaniasis Treatments: Successes, Pitfalls, and Perspectives. Clin Microbiol Rev. 2018; 31(4): 30-1.

Alves EB, Figueiredo F B, Rocha MF, Werneck GL. Operational difficulties in the use of insecticidal dog collars for the control of visceral leishmaniasis, municipality of Montes Claros, MG, Brazil, 2012. Epidemiol Serv Saude. 2018;27 (4):10-1.

Alves EB, Figueiredo FB, Rocha MF, Castro MC, Werneck GL. Effectiveness of insecticide-impregnated collars for the control of canine visceral leishmaniasis. Prev Vet Med. 2020; 182:7-1.

Andrade, AJ, Chaves Júnior, SPC, Morelli, LC, Santos CM, Shimabukuro, PHF. Taxonomia e Sistemática de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) no Brasil e seus Impactos na Saúde Pública. In: Oliveira, J, Alevi, KCC, Camargo, LM, Meneguetti, DUO (Eds.), Atualidades em medicina tropical no Brasil: Vetores. Strictu Sensu, Rio Branco, p. 137–153, 2023.

Aronson N, Herwaldt BL, Libman M, Pearson R, Lopez VR, Weina P, Carvalho EM, Ephros M, Jeronimo S, Magill A. Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). Clin Infect Dis. 2016 15;63(12):1539-1557.

Aronson NE, Magill, AJ. Leishmaniasis. Hunter Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases. 2020:776–798.

Aragão MB. A resistência aos inseticidas e sua medida em mosquitos. Rev. Soc Bras Med Trop, 1972;4(2):104-100.

Aklilu E, Yared S, Gebresilassie A, Legesse B, Hailu A. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of Ethiopia. Heliyon. 2023; 9(3):15-1.

Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 3;10(3):40-1.

Araki AS, Ferreira GE, Mazzoni CJ, Souza NA, Machado RC, Bruno RV, Peixoto AA. Multilocus analysis of divergence and introgression in sympatric and allopatric sibling species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 17(10): 13-1.

Amóra SS, Bevilaqua CM, Feijó FM, D Alves N, do V Maciel M. Control of phlebotomine (Diptera: Psychodidae) leishmaniasis vectors. *Neotrop Entomol*. 2009; 38(3):303-10.

Alexander, B. and Maroli, M. Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Ento*. 2003; 17: 18-1.

Brasil, Ministério da Saúde, Guia de Vigilância em Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. – 5. ed. rev. e atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2022, p.1.126.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014. 120p.: il. Color – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Brasília (DF): NOTA TÉCNICA No 5/2021-CGVZ/DEIDT/SVS/MS. 2021. 6p.

Bray DP, Alves GB, Dorval ME, Brazil RP, Hamilton JG. Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* to experimental chicken sheds treated with insecticide. *Parasit Vectors*. 2010;3(16):11-1.

Bray DP, Hamilton JG. Insecticide-impregnated netting as a potential tool for long-lasting control of the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* in animal shelters. *Parasit Vectors*. 2013; 4(6):7-1.

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

Barata RA, Michalsky EM, Fujiwara RT, França SJC, Rocha MF, Dias ES. Assessment of sandfly (Diptera, Psychodidae) control using cypermethrin in an endemic area for visceral leishmaniasis, Montes Claros, Minas Gerais state, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2011;27 (11):2117-2123.

Bidabadi L, Oshaghi MA, Enayati AA, Akhavan AA, Zahraei-Ramazani AR, Yaghoobi-Ershadi MR, Rassi Y, Aghaei-Afshar A, Koosha M, Arandian MH,

Ghanei M, Ghassemi M, Vatandoost H. Molecular and Biochemical Detection of Insecticide Resistance in the Leishmania Vector, *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to Dichlorodiphenyltrichloroethane and Pyrethroids, in Central Iran. J Med Entomol. 2022;59(4):1347-1354.

Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. Lancet. 2018; 15;392(10151):951-970.

Burgess ER, King BH, Geden CJ. Oral and Topical Insecticide Response Bioassays and Associated Statistical Analyses Used Commonly in Veterinary and Medical Entomology. J Insect Sci. 2020;20(6):9-1.

Bhattarai NR, Van der Auwera G, Rijal S, Picado A, Speybroeck N, Khanal B, De Doncker S, Das ML, Ostyn B, Davies C, Coosemans M, Berkvens D, Boelaert M, Dujardin JC. Domestic animals and epidemiology of visceral leishmaniasis, Nepal. Emerg Infect Dis. 2010;16(2):231-7.

Basto TA, Linhares G C, Madrid DC. Identificação morfológica de flebotomíneos capturados em área urbana. Cienc. anim. Bras.2016;17(3):395-401.

Carneiro LA, Lima LV, Campos MB, Vasconcelos Dos Santos T, Ramos PK, Laurenti MD, Silveira FT. Prevalence and incidence of canine visceral leishmaniasis and its clinical-immunological features in an endemic area of the Brazilian Amazon. Vet Med Sci. 2023; 9(6):2463-2474.

Camargo NVLF, Calemes EB, Rodas LAC, Galvis-Ovallos F, Silva LJD. Control of Canine Visceral Leishmaniasis: A Success Case Based on Deltamethrin 4% Collars. Epidemiologia (Basel). 2021; 14;2(4):502-518.

Campos KB, Martins AJ, Rodovalho CM, Bellinato DF, Dias LDS, Macoris MLDG, Andrighetti MTM, Lima JBP, Obara MT. 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. Parasit Vectors. 2020;13(1): 18-1.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guideline for evaluating insecticide resistance in vectors using the CDC bottle bioassay. 2010.

Costa DC, Bermudil PM, Rodas LC, Nunes MC, Hiramoto RM. Human visceral leishmaniasis and relation ship with vector and canine control measures. Ver. Saúde Pública.2018; (52): 11-1.

Costa DNCC, Codeço CT, Bermudi PMM, Rodas LAC, Nunes CM, Hiramoto RM, Tolezano JE, Chiaravalloti Neto F. Control of canine visceral leishmaniasis

by euthanasia: estimated effect based on a survey and mathematical modeling. *Cad Saude Publica*. 2020;36(2):14-1.

Costa LG, Giordano G, Guizzetti M, Vitalone A. Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Front Biosci*. 2008; 13: 1249-1240.

Comite de Ação à Resistencia a Inseticidas (IRAC). Você sabe o que é resistência das pragas aos inseticida? .2021.

Costa CS, Henriques LF, Ferreira ITRN. Aspectos da Educação em Saúde no contexto das doenças transmitidas por vetores. *BEPA* 2015;12(135-136):54-50.

Costa DP. Resistência a inseticidas neurotóxicos e seus mecanismos em populações brasileiras de *Leucoptera coffeella*.(Dissertação). Universidade Federal de Viçosa, 2013.

Chaves AF, Costa IS, Brito MO, Neto FA, Mascarenhas DM. Visceral leishmaniasis historical series of hospitalized patients and correlation with climate in na endemic área in Minas Gerais, Brazil. *J Bras Med Lab*. 2022; 31(5):7-1.

Casari AE, Alonso DP, Franco KG, Alvarez MVN, Barrios SPG, Fernandes WS, Infran JOM, Rodrigues ACM, Ribolla PEM, Oliveira AG. Macrogeographic genetic structure of *Lutzomyia longipalpis* complex populations using Next Generation Sequencing. *PLoS One*. 2019;14(10):15-1.

Cabrera A, Pita S, González T, Viera A, Verger L, Piegas S, Willat G, Fresia P, Basmadján Y. Genetic variability highlights the invasion route of the *Lutzomyia longipalpis* complex, the main vector of Visceral Leishmaniasis in Uruguay. *Zoonoses Public Health*. 2023; 70(5):383-392.

Cecílio P, Cordeiro SA, Oliveira F. Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* parasites. *Commun Biol*. 2022;5(1):12-1.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Leishmaniasis. 2017: Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>.

Dantas TF, Brandão FSP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006;48(3):151-6.

David, JR, Stamm, L, Bezerra, H, Souza, R, Killick K R, Lima, J. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2001. 9(6):839-47.

Denlinger DS, Hudson SB, Keweshan NS, Gompert Z, Bernhardt SA. Standing genetic variation in laboratory populations of insecticide-susceptible *Phlebotomus papatasi* and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) for the evolution of resistance. *Wiley*. 2021; 14 (5):15-1.

Denlinger DS, Creswell JA, Anderson JL, Reese CK, Bernhardt SA. Diagnostic doses and times for *Phlebotomus papatasi* and *Lutzomyia longipalpis* sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) using the CDC bottle bioassay to assess insecticide resistance. *Parasit Vectors*. 2016;9 (212):11-1.

Denholm, I., & Devine, G. (2013). *Insecticide Resistance*. *Encyclopedia of Biodiversity*, 2013; 298–307.

Díaz SV, Merindo G, Morales YM, Corpas LV, Pratlong F, Morillas MF, Martín SJ. High rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma nabiasi* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in sympatric and syntrophic conditions in an endemic canine leishmaniasis area: epidemiological consequences. *Vet Parasitol*. 2014; 28;202(3-4):119-27.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Phlebotomine sand flies factsheet for experts, [https:// www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/phlebotomine-sand-flies](https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/phlebotomine-sand-flies) (2014).

Esch KJ, Petersen CA. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin Microbiol Rev*. 2013; 26(1): 85-58.

Edi CV, Koudou BG, Jones CM, Weetman D, Ranson H. Multiple-insecticide resistance in *Anopheles gambiae* mosquitoes, Southern Côte d'Ivoire. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(9):1511-1506.

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

Franssen SU, Durrant C, Stark O, Moser B, Downing T, Imamura H, Dujardin JC, Sanders MJ, Mauricio I, Miles MA, Schnur LF, Jaffe CL, Nasereddin A, Schallig H, Yeo M, Bhattacharyya T, Alam MZ, Berriman M, Wirth T, Schönian G, Cotton JA. Global genome diversity of the *Leishmania donovani* complex. *Elife*. 2020; 25(9): 44-1.

Flores AV. Organoclorados: um problema de saúde pública. *Ambiente & Sociedade*.2004; 7(2): 124-111.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Instruções para pessoal de combate ao vetor: Manual de normas técnicas. (2021).

Galati EAB, Rodrigues BL. A Review of Historical Phlebotominae Taxonomy (Diptera: Psychodidae). *Neotrop Entomol*. 2023; 52(4):539-559.

Galati, EAB 2015. Apostila de bioecologia e identificação de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) – Departamento de Epidemiologia p. 127, Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, Brasil.

Gan SJ, Leong YQ, Bin Barhanuddin MFH, Wong ST, Wong SF, Mak JW, Ahmad RB. Dengue fever and insecticide resistance in *Aedes* mosquitoes in Southeast Asia: a review. *Parasit Vectors*. 2021; 14(1):19-1.

Gálvez R, Montoya A, Fontal F, Martínez De Murguía L, Miró G. Controlling phlebotomine sand flies to prevent canine *Leishmania infantum* infection: A case of knowing your enemy. *Res Vet Sci*. 2018; (121):94-103.

Gutierrez MAC, Lopez ROH, Ramos AT, Vélez ID, Gomez RV, Arrivillaga-Henríquez J, Uribe S. DNA barcoding of *Lutzomyia longipalpis* species complex (Diptera: Psychodidae), suggests the existence of 8 candidate species. *Acta Trop*. 2021; (221):9-1.

González, MA, Bell, MJ, Bernhardt, SA. Susceptibility of wild-caught *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sand flies to insecticide after an extended period of exposure in western São Paulo, Brazil. *Parasites Vectors* . 2019; 12(110): 9-1.

Gomes ADC. Vigilância Entomológica. *Iesus* 2002; (11): 90–79.

Gontijo C F, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol*. 2004;7 (3):338-349.

Halliday, WR, Burnham KP. Choosing the optimal diagnostic dose for monitoring insecticide resistance. *J. Econ. Entomol* 1990; 83: 1159–1151.

Hayd RLN, Carrara L, de Melo Lima J, de Almeida NCV, Lima JBP, Martins AJ. Evaluation of resistance to pyrethroid and organophosphate adulticides and kdr genotyping in *Aedes aegypti* populations from Roraima, the northernmost Brazilian State. *Parasit Vectors*. 2020;13(1): 9-1.

Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004; 34(7):653-65

Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol*. 2000; 45: 371-91.

Ibiapina AB, Batista FMA, Aguiar BGA, Mendonça VJ, Costa DL, Costa CHN, Abdala CVM. Evidence map of diagnosis, treatment, prognosis, prevention, and control in visceral leishmaniasis. *Rev Panam Salud Publica*. 2022; 46: 10-1.

Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) insecticide Resistance: Causes and Action.

Joshi AB, Banjara MR, Das ML, Ghale P, Pant KR, Parajuli N, Pyakurel UR, Dahal GR, Das CL, Kroeger A, Aseffa A. Prevalence of post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) and treatment seeking behavior of PKDL patients in Nepal. *PLoS Negl Trop Dis*. 2023; 17(2): 13-1.

Kazimoto TA, Amora SSA, Figueiredo FB, Magalhães JME, Freitas YBN, Sousa MLR, Melo AECDS, Campos MP, Alves ND, Werneck GL. Impact of 4% Deltamethrin-Impregnated Dog Collars on the Prevalence and Incidence of Canine Visceral Leishmaniasis. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2018; 18(7):356-363.

Kaufer A, Ellis J, Stark D, Barratt J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):287.

Karunarathne P, Pocquet N, Labbé P, Milesi P. BioRssay: an R package for analyses of bioassays and probit graphs. *Parasit Vectors*. 2022; 15(1):6-1.

Killick KR. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol*. 1999; 17 (3):279-89.

Kishore K, Kumar V, Kesari S, Dinesh DS, Kumar AJ, Das P, Bhattacharya SK. Vector control in leishmaniasis. *Indian J Med Res*. 2006; 123(3):467-72.

Kumar P, Chatterjee M, Das NK. Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis: Clinical Features and Differential Diagnosis. *Indian J Dermatol*. 2021; 66(1):24-33

Lins RM, Souza NA, Brazil RP, Maingon RD, Peixoto AA. Fixed differences in the paralytic gene define two lineages within the *Lutzomyia longipalpis* complex producing different types of courtship songs. *PLoS One*. 2012;7(9):8-1.

Lainson R, Rangel E F..*Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - a review. *Mem Inst Oswaldo*. 2005; 100:827-811.

Longo C. Mutações envolvidas com a resistência a inseticidas em populações naturais de *Culex quinquefasciatus* (Say 1823) do Rio de Janeiro. Monografia. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro,2016.

Lopes RP, Lima JBP, Martins AJ. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 in Brazil: a review. *Parasit Vectors*. 2019;18;12(1):12-1.

Martins, IM, Silva JS, Campos DK, Oliveira R S, Silva PL, Carvalho S F, Antônio PC . Visceral leishmaniasis: historical series of hospitalized patients and correlation with climate in an endemic area in Minas Gerais, Brazil. *J Bras Patol Med Lab.* 2021; (57):7-1.

Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol.* 2013; 27(2):123-47.

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

Marcondes, CB 2007. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomological News* 118: 351-356.

Mangabeira O. Sobre a sistemática e Biologia dos *Phlebotomus* do Ceará. *Soc. Bras. Med. Trop.* 1969; (21): 3–25.

Matambo TS, Abdalla H, Brooke BD, Koekemoer LL, Mnzava A, Hunt RH, Coetzee M. Insecticide resistance in the malarial mosquito *Anopheles arabiensis* and association with the *kdr* mutation. *Med Vet Entomol.* 2007; 21(1):97-102.

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

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(3):315-322.

Mara EFB, Janessa AZ. A Química dos Agrotóxicos. *Qui Soc.*2012; 34(1):10-15.

Minho AP, Gaspar E B, Domingues R. Guia Prático para Determinação de Curva Dose-Resposta e Concentração Letal em Bioensaios com Extratos Vegetais. Embrapa, 2016.

Moreira, MF1, Mansur JF; Mansur JF. Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos. INCT.2012.

Montenegro QCA, Buhler C, Horstick O, Runge-Ranzinger S, Rahman KM. Efficacy and community-effectiveness of insecticide treated nets for the control of visceral leishmaniasis: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022 Mar 2;16(3): 27-1.

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

Oliveira, VVG, Alves LC, Junior VAS. Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals. *Ciência Rural*. 2015; 45(9): 1628-1622.

Pace D. Leishmaniasis. *J Infect*. 2014 (69): 17-12.

Obara MT , Otrera VMG , Gonçalves RG , Santos JP, Santalucia M , Rosa JR , Almeida OS, Barata JMS. Monitoring the susceptibility of *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae) to deltamethrin insecticide, in Central-Western Brazil. *Rev Soc Bras*. 2011; 44(2):206-212.

Palatnik SCB, Day MJ. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2011; 4(197): 10-1.

Pradhan S, Schwartz RA, Patil A, Grabbe S, Goldust M. Treatment options for leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol*. 2022; 47(3):516-521.

Pedrosa CMS. Clinical Manifestations of Visceral Leishmaniasis (American Visceral Leishmaniasis). *The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis*. InTech. 2017.

Perea EZ, Balta León R, Palomino Salcedo M, Brogdon WG, Devine GJ. Adaptation and evaluation of the bottle assay for monitoring insecticide resistance in disease vector mosquitoes in the Peruvian Amazon. *Malar J*. 2009 Sep 3;8:208. doi: 10.1186/1475-2875-8-208. PMID: 19728871; PMCID: PMC2742550.

Pereira AM, Rodrigues MMS, Medeiros JF. Updating the knowledge of sand flies (Diptera, Psychodidae) in Rondônia State, Brazil. *Biodivers*. 2022; 16(10): 49-1.

Pessoa GC, Lopes JV, Rocha MF, Pinheiro LC, Rosa AC, Michalsky ÉM, Dias ES. Baseline susceptibility to alpha-cypermethrin in *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) from Lapinha Cave (Brazil). *Parasit Vectors*. 2015; 17(8):8-1.

Picollo MI, Vassena C, Santo Orihuela P, Barrios S, Zaidemberg M, Zerba E. High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J Med Entomol.* 2005; 42(4):642-637.

Picado A, Kumar V, Das M, Burniston I, Roy L, Suman R, Dinesh D, Coosemans M, Sundar S, Shreekant K, Boelaert M, Davies C, Cameron M. Effect of untreated bed nets on blood-fed *Phlebotomus argentipes* in kala-azar endemic foci in Nepal and India. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Dec;104(8):1183-1186.

Rêgo FD, Soares RP. *Lutzomyia longipalpis*: an update on this sand fly vector. *An Acad Bras Cienc.* 2021;93 (3):29-1.

Reithinger R, Coleman PG, Alexander B, Vieira EP, Assis G, Davies CR. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *Int J Parasitol.* 2004; 34(1):55-62.

Ribeiro RR, da Silva SM, Fulgêncio Gde O, Michalick MS, Frézard FJ. Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2013; 22(3):373-8.

Ribeiro, BM, Machado MA , Novelli VM, Sato ME, Astúa JF. Potencial de aplicação de técnicas alternativas para monitoramento e detecção de resistência a pesticidas em artrópodes-praga de citros. *Citrus R&T.* 2007; 28(1-2): 16-1.

Rocha DA, Andrade AJ, Moura LR, Figueiredo NG, Pessoa GCD, Obara MT. Susceptibility of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) collected in the field, to alpha-cypermethrin in four municipalities endemic to leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2020; 62(38): 4-1.

Rocha DA, Costa LMD, Pessoa GDC, Obara MT. Methods for detecting insecticide resistance in sand flies: A systematic review. *Acta Trop.* 2021.

Rocha L. Leishmanioses: conheça os insetos transmissores e saiba como se prevenir. Portal FIOCRUZ. Acesso em: 19 de jan 2024.

Rocha DA, Costa LM, Pessoa GCD, Obara MT. Standardization of laboratory bioassays for the study of *Lutzomyia longipalpis* (diptera: psychodidae) susceptibility to pyrethroid insecticides. In: Oliveira, J, Alevi, KCC, Camargo, LM, Meneguetti, DUO (Eds.), *Atualidades em medicina tropical no Brasil: Vetores. Strictu Sensu*, Rio Branco, p. 137–153,2023.

Rodríguez MM, Crespo A, Hurtado D, Fuentes I, Rey J, Bisset JA. Diagnostic Doses of Insecticides for Adult *Aedes aegypti* to Assess Insecticide Resistance in Cuba. *J Am Mosq Control Assoc.* 33(2):142-144.

Roy L, Uranw S, Cloots K, Smekens T, Kiran U, Pyakurel UR, Das ML, S Yadav R, Van Bortel W. Susceptibility status of the wild-caught *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), the sand fly vector of visceral leishmaniasis, to different insecticides in Nepal. *PLoS Negl Trop Dis.* 2022; 16(7): 18-14.

Scarpini S, Dondi A, Totaro C, Biagi C, Melchionda F, Zama D, Pierantoni L, Gennari M, Campagna C, Prete A, Lanari M. Visceral Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment Regimens in Different Geographical Areas with a Focus on Pediatrics. *Microorganisms.* 2022; 21;10(10):13-1.

Santamaría E, Munstermann LE, Ferro C. Aproximación al método CDC para determinar susceptibilidad a insecticidas en vectores de leishmaniasis [Approximation to the CDC method to determine insecticide susceptibility in leishmaniasis vectors]. *Biomedica.* 2003; 23(1):121-115.

Salomón OD, Feliciangeli MD, Quintana MG, Afonso MM, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015; 110(7):831-46.

Safavi, M, Eshaghi, H, Hajihassani, Z. Visceral Leishmaniasis: Kala-Azar. *Diagn. Cytopathol.* 2021; (49): 448–446.

Saeidi Z, Vatandoost H, Zaim M, Ahmadkhaniha R, Rassi Y, Zahraei-Ramazani A, Arandian MH, Jafari R, Galani YJH, Sanei-Dehkordi A, Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA. Evaluation of Susceptibility Status of *Phlebotomus papatasi*, the Main Vector of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis, to Different WHO Recommended Insecticides in an Endemic Focus, Central Iran. *J Arthropod Borne Dis.* 2021; 31;15(4):366-379.

Sena JM De (2011). *Vigilância entomológica do Programa de Leishmaniose Visceral: limites e possibilidade para o monitoramento das ações.* Dissertação de Mestrado - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. 159pp.

Serafim TD, Iniguez E, Oliveira F. *Leishmania infantum*. *Trends Parasitol.* 2020; 36(1):80-81.

Silva AB, Freitas FI, Mota C A, Maria EM, Campos HF, Lima CM. Analysis of the factors that influence the occurrence of human visceral leishmaniasis. *Cogit. Enferm.* 2021; (26):12-1.

Silva J D, Melo H M, Costa A.G, Costa D F, Silva B S, Melo, M A. Leishmaniose visceral em cães de assentamentos rurais. *Pesq Vet Bras.*2017; 73 (11):1292-1298.

Silva RA, Andrade AJ, Quint BB, Raffoul GS, Werneck GL, Rangel EF. Effectiveness of dog collars impregnated with 4% deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2018;113 (5):9-1.

Silveira, NSD, Mendes, EM, Pereira, ML., Tavela, AO., Veiga, APM, Zimmermann, FC. Visceral Leishmaniasis in Dogs. *Acta Scientiae Veterinariae.* 2021.

Siddiqui JA, Fan R, Naz H, Bamisile BS, Hafeez M, Ghani MI, Wei Y, Xu Y, Chen X. Insights into insecticide-resistance mechanisms in invasive species: Challenges and control strategies. *Front Physiol.* 2023.

Shirani-Bidabadi L, Oshaghi MA, Enayati AA, Akhavan AA, Zahraei-Ramazani AR, Yaghoobi-Ershadi MR, Rassi Y, Aghaei-Afshar A, Koosha M, Arandian MH, Ghanei M, Ghassemi M, Vatandoost H. Molecular and Biochemical Detection of Insecticide Resistance in the Leishmania Vector, *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to Dichlorodiphenyltrichloroethane and Pyrethroids, in Central Iran. *J Med Entomol.* 2022; 59(4):1347-1354.

Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9(5):958-951.

Shimabukuro PHF, de Andrade AJ, Galati EAB. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. *Zookeys.* 2017; 8(660):67-106.

Spiegel CN, Dias DB, Araki AS, Hamilton JG, Brazil RP, Jones TM. The *Lutzomyia longipalpis* complex: a brief natural history of aggregation-sex pheromone communication. *Parasit Vectors.* 2016; 9(1):15-1.

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

Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011; 105(1):6-1.

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

Singh RK, Mittal PK, Dhiman RC. Insecticide susceptibility status of *Phlebotomus argentipes*, a vector of visceral leishmaniasis in different foci in three states of India. *J Vector Borne Dis.* 2012; 49(4):254-257.

Travi BL, Cordeiro-da-Silva A, Dantas- Torres F, Miro G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018, 12(1): 13-1.

Toé HK, Zongo S, Guelbeogo MW, Kamgang B, Viana M, Tapsoba M, Sanou A, Traoré A, McCall PJ, Sagnon N. Multiple insecticide resistance and first evidence of V410L kdr mutation in *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) from Burkina Faso. *Med Vet Entomol.* 2022; 36(3):309-319.

Ueslei T, Eunice ABG and João Balduino Kühl, Lozovei, LA, Barbosa OC. Controle de flebotomíneos com DDT, em área endêmica de leishmaniose tegumentar no estado do Paraná, sul do Brasil. *Braz arch biol technol.* 1998; 41(3): 6-1.

Valle D, Bellinato DF, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Martins Junior AJ. Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2019; 114: 17-1.

Vassena CV, Picollo MI, Zerba EN. Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Med Vet Entomol.* 2000;14(1):55-51.

Vanessa AB, Souza CF, Pereira A, Gatherer D, Brazil RP, Bray DP, Hamilton JGC. Insecticide-impregnated netting: A surface treatment for killing *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the vector of *Leishmania infantum*. *Curr Res Parasitol Vector Borne Dis.* 2021;1:10-1.

Vargas, FO, Córdova A A. Determinación de la resistencia a insecticidas em *Aedes aegypti*, *Anopheles albimanus* y *Lutzomyia peruensis* procedentes del Norte Peruano. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública.* 2006; 23 (4): 259-264.

While, C, Resolution,W, Sixtieth,W, Health, A. Global Leishmaniasis Surveillance Le Point Sur La Situation Mondiale de La Leishmaniose, 1998–2016. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2018; (93):530–540.

WHO. World Health Organization. Determining discriminating concentrations of insecticides for monitoring resistance in sand flies: report of a multi-centre laboratory study and WHO expert consultations. Geneva: World Health Organization; Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, 2022a.

WHO. World Health Organization. Standard operating procedures for testing insecticide susceptibility of adult mosquitoes in WHO bottle bioassays. Geneva: World Health Organization; 2022b.

Yewhalaw D, Wassie F, Steurbaut W, Spanoghe P, Van Bortel W, Denis L, Tessema DA, Getachew Y, Coosemans M, Duchateau L, Speybroeck N. Multiple insecticide resistance: an impediment to insecticide-based malaria vector control program. *PLoS One*. 2011;6(1):7-1.

Zijlstra, EE. The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). *Parasit Vectors*. 2016; 9(1): 9-1.

Apêndice I

Coordenadas geográficas dos pontos de coleta de *Lu. longipalpis* expostos aos bioensaios de garrafa do CDC impregnadas com o piretróide deltametrina, em 2023.

Estado	Município	Bairro	Latitude	Longitude
Paraná	Foz do iguaçu	Vila Portes	25°51'85.3"	54°59'78.3"
Paraná	Foz do iguaçu	Vila Portes	25°51'74.6"	54°89'84.5"
Paraná	Foz do iguaçu	Vila A	25°52'07.0"	54°59'13.8"
Paraná	Foz do iguaçu	vila A	25°31'14.3"	54°35'29.2"
Paraná	Foz do iguaçu	Carimá	25°58'68.1"	54°54'60.7"
Paraná	Foz do iguaçu	Mata Verde	25°35'80.1"	54°33'14.1"
Paraná	Foz do iguaçu	Vila Maracanã	25°56'68.0"	54°53'26.5"
Paraná	Foz do iguaçu	Buba	25°56'50.9"	54°55'37.0"
Paraná	Foz do iguaçu	Jardim das palmeiras	25°29'26.7"	54°32'26.3"
Paraná	Foz do iguaçu	Jardim Polo Centro	25°31'25.3"	54°33'42.5"
Paraná	Foz do iguaçu	Porto Meira	25°58'56.1"	54°57'25.0"
Paraná	Foz do iguaçu	Jardim Cedro	25°28'24.5"	54°32'14.8"
Ceará	Fortaleza	Pacheco	3°41'27.1"	38°38'21.9"
Ceará	Fortaleza	Pacheco	3°41'28.9"	38°38'05.5"
Ceará	Fortaleza	Pacheco	3°41'20.3"	38°38'24.9"
Ceará	Fortaleza	Pacheco	3°41'16.5"	38°38'48.5"
Ceará	Fortaleza	Barra Vermelha	3°41'28.1"	38°36'40.5"
Ceará	Fortaleza	Barra Vermelha	3°41'28.9"	38°36'38"
Ceará	Fortaleza	Barra Vermelha	3°41'27.5"	38°36'53.9"
Ceará	Fortaleza	Barra Vermelha	3°41'28"	38°37'08.7"
Ceará	Caucáia	Guadalajara	3°45'54.6"	38°37'05.0"
Piauí	Teresina	P9. Firmino filho	4°59'24.1"	42°49'49.9"
Piauí	Teresina	Stª Maria das Vassuras	4°59'27.1"	42°50'14.6"
Piauí	Teresina	Stª Maria das Vassuras	4°58'59.4"	42°49'25.3"
Piauí	Teresina	Monte Verde	5°00'04.7"	42°49'21.0"
Piauí	Teresina	Monte Verde	5°01'19.3"	42°47'15.4"
Piauí	Teresina	Pedra Mole	5°02'51.7"	42°45'53.7"
Piauí	Teresina	Satélite	5°02'51.7"	42°45'53.7"

Estado	Município	Bairro	Latitude	Longitude
Minas Gerais	Montes Claros	Loudes	16°43'37.9"	43°51'01.9"
Minas Gerais	Montes Claros	Independência	16°42'45.6"	43°49'02.1"
Minas Gerais	Montes Claros	Independência	16°42'48.7"	43°48'18.4"
Minas Gerais	Montes Claros	Vila Greice	16°75'32.5"	43°86'85.6"
Minas Gerais	Montes Claros	Amazonas	16°41'49.0"	43°51'52.6"
Minas Gerais	Montes Claros	Nossa Senhora de Fátima	16°44'18.8"	43°51'01.2"
Goiás	Cavalcante	Malhadinha-Vão do moleque	13°32'65.2"	047°37'97"
Goiás	Cavalcante	Malhadinha-Vão do moleque	13°32'07"	47°38'15.8"
Goiás	Cavalcante	Malhadinha-Vão do moleque	13°32'34.4"	47°38'15.8"
Goiás	Cavalcante	Malhadinha-Vão do moleque	13°.33'20.0"	47°37'99.9"
Goiás	Cavalcante	Malhadinha-Vão do moleque	13°.33'21.5"	47°.37'76.0"
Goiás	Cavalcante	Malhadinha-Vão do moleque	13°.33'08.2"	47°.39'.63.2"
Goiás	Cavalcante	Malhadinha-Vão do moleque	13°.33'02.4"	47°.39'69.8"
Goiás	Cavalcante	Malhadinha-Vão do moleque	13°.33'00.6"	47°.39'98.1"
Goiás	Cavalcante	Malhadinha-Vão do moleque	13°.33'75.1"	47°40'88.2"
Goiás	Cavalcante	Taboca-Vão do moleque	13°29'.45.2"	47°43'83.38"
Goiás	Cavalcante	Taboca-Vão do moleque	13°28'74.6"	47°43'93.28"
Goiás	Cavalcante	Taboca-Vão do moleque	13°29'99.5"	47°41'92.2"
Goiás	Cavalcante	Taboca-Vão do moleque	13°29'84.52"	47°42'00.1"
Goiás	Cavalcante	Taboca-Vão do moleque	13°29'70.88"	47°42'15.08"
Goiás	Cavalcante	Taboca-Vão do moleque	13°30'72.15"	47°41'67.25"
Goiás	Cavalcante	Taboca-Vão do moleque	13°31'09.45"	47°43'30.73"
Goiás	Cavalcante	Taboca-Vão do moleque	13°31'76.80"	47°43'30.52"

Data: _____

Espécie: _____

Dose diagnóstica: _____

Inseticida: _____

Local de coleta: _____

Bioensaio : _____ T: _____ °C UR: _____ %

Temp o (min)	Frasco 1		Frasco 2		Frasco 3		Frasco 4		Frasco 5		Frasco 6		Controle		Somatório	
	Dose (ug/mL)		Dose (ug/mL)		Dose (ug/mL)		Dose (ug/mL)		Dose (ug/mL)		Dose (ug/mL)		Dose (ug/mL)			
	Iníci o	(N)	Iníci o	(N)	Iníci o	(N)	Iníci o	(N)	Iníci o	(N)	Iníci o	(N)	Iníci o	(N)	Total (n):	
	Vivo	Mort o	Vivo	Mort o	Vivo	Mort o	Vivo	Mort o	Vivo	Mort o	Vivo	Mort o	Vivo	Mort o	Total morto s	% Morto s
0																
10																
20																
30																
40																
50																
60																
Total															Média mortalidade (%)	

Informação sobre o encoleiramento das áreas onde foram realizados os bioensaios de suscetibilidade

Estado	Município	Início do encoleiramento	1º Ciclo/ATLs	2º Ciclo/ATLs	3º Ciclo/ATLs
Ceará	Fortaleza	29/07/2021	-29 ATL contempladas -68.520 cães	-28 ATLs contempladas - 53.947 cães encoleirados	- Sem informação
Ceará	Caucaía	13/04/2022	- 1 ATL contemplada - 276 cães encoleirados	- 1 ATL contemplada - 399 cães encoleirados	- Sem informação
Piauí	Teresina	09/12/2021	- 2 ATL contemplada - 8913 cães encoleirados	- 2 ATL contemplada - 11.021 cães encoleirados	- 2 ATL contemplada - 8.643 cães encoleirados
Minas Gerais	Montes Claros	11/05/2023	- 1 ATL contemplada - 127 cães encoleirados	- 1 ATL contemplada - 292 cães encoleirados	- 2 ATL contemplada - 154 cães encoleirados
Goiás	Cavalcante	21/08/2023	- 2 ATL contemplada - 359 cães encoleirados	- Sem informação	- Sem informação

*ATLs - Áreas de Trabalho Local.

Apêndice IV

Coleiras caninas impregnadas com inseticidas para o controle da Leishmaniose Visceral: avaliação da suscetibilidade de *Lutzomyia longipalpis* à deltametrina

Mayra de Sousa Félix de Lima¹, Marcos Takashi Obara¹

- 1- Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília
- 2- Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília

Apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Correspondência: marcos.obara@gmail.com

Resumo

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma antropozoonose predominante em áreas tropicais e subtropicais. A LV ocupa a segunda posição em mortalidade e a sétima em perda de anos de vida ajustados por incapacidade entre as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs). O principal vetor da LV é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* e os cães (*Canis familiaris*) são os principais reservatórios domésticos do protozoário *Leishmania infantum*. O uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4%, associada à tratamento químico contra *Lu. longipalpis* pode contribuir para o surgimento de resistência em flebotomíneos. Nesse contexto, o objetivo foi caracterizar o perfil de suscetibilidade de diferentes populações de *Lu. longipalpis* ao piretróide deltametrina em áreas com uso de coleiras impregnadas para controle de LV. Populações de campo de 6 municípios brasileiros foram expostos aos bioensaios de garrafa do CDC impregnados com Dose diagnóstica DD de 21,9 µg/garrafa e 30 µg/garrafa e Dose-Resposta (DR) de 1, 3, 5, 7, 9 e 11 µg/garrafa. *Lu. longipalpis* foi a espécie mais frequentemente coletada em todas as localidades (94%). Para DD de 21,9 µg/garrafa as populações procedentes dos municípios de FOZ, MOC, CAV e TER foram suscetíveis, enquanto que CAU apresentou mortalidade de 87,1%, sugerindo resistência e FOR demonstrou um valor de 94,9% sugerindo possível resistência. Para a DD de 30 µg/garrafa, CAU e TER apresentou possibilidade de resistência,

porém as demais populações foram suscetíveis. RR_{50} variou entre 2,27 a 0,54 e a RR_{95} entre 4,18 e 0,33, apontando baixa resistência. Os valores do coeficiente angular das populações de flebotomíneos de TER, CAU, FOR e MOC apresentaram menor homogeneidade e maior frequência de indivíduos que apresentaram resistência. Conclui-se que a maioria das populações de *Lu. longipalpis* foram suscetíveis ao piretróide deltametrina em áreas com uso de coleiras impregnadas, exceto a população de Caucaia/CE que foi resistente na DD de 21,9 $\mu\text{g/garrafa}$. O monitoramento de resistência de *Lu. longipalpis* deve ser realizado para novas áreas, a fim de subsidiar as ações de controle da LV, no Brasil.

Palavras-chaves: *Lutzomyia longipalpis*, Leishmaniose Visceral, Resistência.

Abstract

Visceral Leishmaniasis (VL) is an anthroponosis prevalent in tropical and subtropical areas. VL ranks second in mortality and seventh in loss of disability-adjusted life years among Neglected Tropical Diseases (NTDs). The main vector of VL is the sandfly *Lutzomyia longipalpis* and dogs (*Canis familiaris*) are the main domestic reservoirs of the protozoan *Leishmania infantum*. The use of collars impregnated with 4% deltamethrin, associated with chemical treatment against *Lu. longipalpis* may contribute to the emergence of resistance in sandflies. In this context, the objective was to characterize the susceptibility profile of different *Lu. longipalpis* populations to the pyrethroid deltamethrin in areas using impregnated collars to control VL. Field populations from 6 Brazilian municipalities were exposed to CDC bottle bioassays impregnated with Diagnostic Dose (DD) of 21.9 $\mu\text{g/bottle}$ and 30 $\mu\text{g/bottle}$ and Dose-Response (DR) of 1, 3, 5, 7, 9 and 11 $\mu\text{g/bottle}$. *Lu. longipalpis* was the most frequently collected species in all locations (94%). For DD of 21.9 $\mu\text{g/bottle}$, populations from the municipalities of FOZ, MOC, CAV and TER were susceptible, while CAU presented a mortality rate of 87.1%, suggesting resistance and FOR demonstrated a value of 94.9%, suggesting possible resistance. For the DD of 30 $\mu\text{g/bottle}$, CAU and TER showed the possibility of resistance, but the other populations were susceptible. RR_{50} varied between 2.27 and 0.54 and RR_{95} between 4.18 and 0.33, indicating low resistance. The values of the angular coefficient of the sand fly populations of TER, CAU, FOR and MOC showed less homogeneity and a higher frequency of individuals that showed resistance. It is concluded that the majority of populations of *Lu. longipalpis* were susceptible to the pyrethroid deltamethrin in areas using impregnated collars, except the population of Caucaia/CE which was resistant at the DD of 21.9 $\mu\text{g/bottle}$. resistance monitoring *Lu. longipalpis* should be carried out in new areas, in order to support VL control actions in Brazil.

Keywords: *Lutzomyia longipalpis*, Visceral Leishmaniasis, Resistance.

Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma antropozoonose predominante em áreas tropicais e subtropicais. A LV ocupa a segunda posição em mortalidade e a sétima em perda de anos de vida ajustados por incapacidade entre as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs). A principal forma de transmissão ao homem ocorre através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas com espécies pertencentes ao gênero *leishmania*, tendo a *Leishmania infantum* com o principal agente etiológico em países da América. Dentre os flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* é considerado o principal vetor da LV, com ampla distribuição no Brasil, Américas do Norte, Central e do Sul (Silva et al. 2021, Martins et al. 2021, Franssen et al. 2020).

A distribuição no mundo da LV concentra-se em 90% dos casos em seis países: Brasil, Índia, Bangladesh, Sudão, Etiópia e Nepal, entretanto a doença permanece endêmica em mais de 60 países. No período de 2001-2021, houveram 69.665 casos novos de LV na Região das Américas, com uma média anual de 2.488 casos confirmados. No Brasil, no ano de 2022, foi registrado 1.684 casos confirmados de LV. A região Nordeste apresentou os maiores casos, sendo 731, com destaque para os Estados no Maranhão e Ceará que registraram 225 e 181 casos respectivamente (Sinan/SVSA/MS, 2023, OPAS 2022, Martins et al. 2021, Batista et al. 2018, Burza et al. 2018).

Devido à falta de uma vacina segura e eficiente para combater a LV, assim como a baixa adesão ao tratamento. As ações de controle da LV são centradas no hospedeiro, por meio de inquérito sorológicos de cães, utilizando-se da eutanásia quando são sorroagentes positivos, como também, são direcionadas para educação em saúde, tratamento de casos humanos, manejo ambiental, e como medida de proteção individual para o principal reservatório coleiras impregnadas com deltametrina (Costa et al. 2020, Costa et al. 2018, Silva et al. 2017). Essas coleiras contém um produto

com função repelente e protegem o cão contra a picada de fêmeas de flebotomíneos, reduzindo dessa forma a interação vetor hospedeiro, de certa forma reduzindo o ciclo de transmissão (Silva et al. 2018).

Ademais, o Ministério da Saúde do Brasil, desde 2003, recomenda a pulverização de unidades domiciliares com o inseticida alfa-cipermetrina para o controle de flebotomíneos em áreas com transmissão da LV, sendo essa medida a mais recomendada (Neves et al. 2007). Entretanto, o uso frequente e indiscriminado de inseticidas, com um histórico de mais de 60 anos de uso de controle químico favorece o surgimento de populações resistentes de flebotomíneos.

Com isso, o monitoramento da suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas, principalmente em áreas com uso de coleiras impregnadas, torna-se fundamental para aprimorar as ações de controle vetorial, tendo em vista que essa tecnologia de controle utiliza piretróide, por exemplo, deltametrina, além de que, populações resistentes de flebotomíneos a inseticidas já foram registrados em vários países do Velho mundo. Dessa forma, considerando o aumento de casos de LV no Brasil, e a probabilidade do vetor *Lu. longipalpis* vim a desenvolver resistência a inseticidas utilizados no seu controle, este estudo teve como objetivo caracterizar o perfil de suscetibilidade de diferentes populações de *Lu. longipalpis* ao piretróide deltametrina em áreas com uso de coleiras impregnadas para controle de LV.

Material e métodos

Área de estudo

Os flebotomíneos foram capturados nos municípios de Foz do Iguaçu/PR (S 25° 32' 49" W 54° 35' 18"), Fortaleza/CE (S 3° 43' 6" W 38° 32' 36"), Caucaia/CE (S 3° 44' 4" W 38° 39' 23"), Teresina/PI (S 5° 5' 21" W 42° 48' 6"), Montes Claros /MG (S 16° 44' 13" W 43° 51' 53") e Cavalcante/GO (S 13° 47' 51" W 47° 27' 20") conforme mostra Figura 1. Os municípios foram selecionados conforme os seguintes critérios: i) elevada transmissão de LV;

ii) uso de coleiras impregnadas a longo prazo; iii) realização de um programa específico de controle de LV e iv) casas com presença de cães com LV.

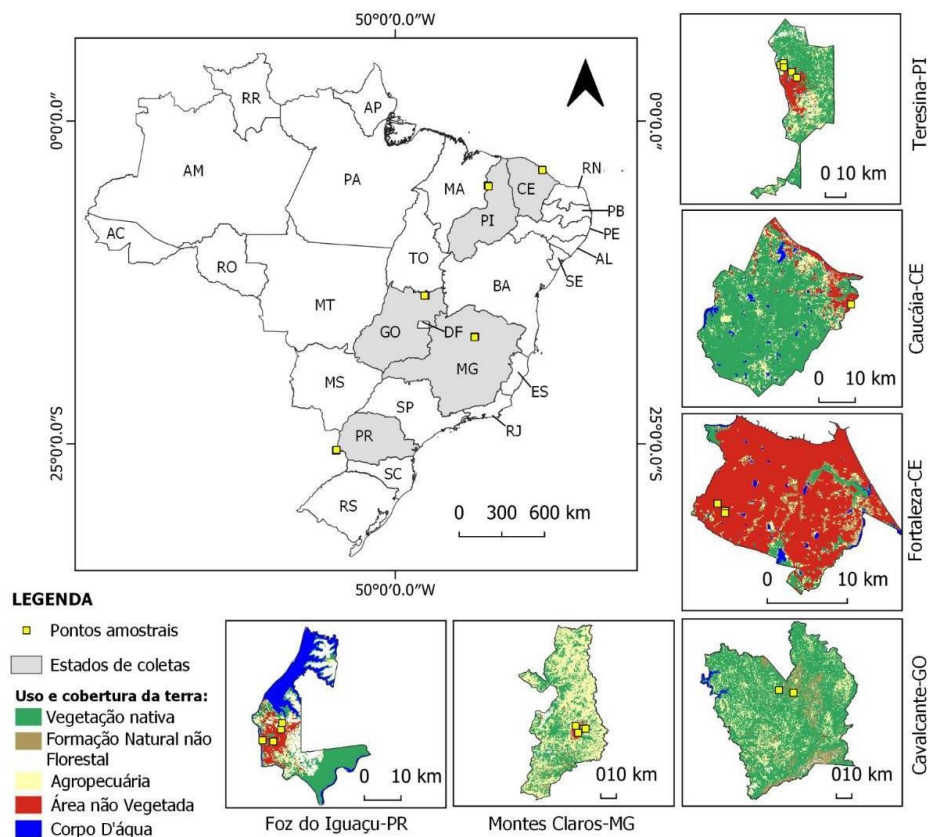


Figura 1. Mapa do Brasil mostrando os estados (cinza) e os municípios onde foram realizadas as coletas e bioensaios com garrafas do CDC para avaliação de suscetibilidade de *Lu. longipalpis* expostos ao inseticida deltametrina, em 2023. Fonte: MapBiomas (2023).

Flebotomíneos de campo

As coletas ocorreram por meio de armadilhas luminosas do tipo HP e/ou CDC, as quais foram instaladas no peridomicílio das residências durante três noites consecutivas (17:00 às 08:00). Para seleção das casas foi utilizado critérios como: presença de vegetação, matéria orgânica acumulada, animais domésticos, locais sombreados e úmidos.

As armadilhas eram recolhidas durante o período da manhã e os flebotomíneos foram transportados em caixas de poliestireno (isopor) contendo papel toalha umedecida. Nos laboratórios de entomologia municipais, as armadilhas eram separadas em positivas e negativas para presença de flebotomíneos. Por fim, os flebotomíneos coletados na armadilha tipo CDC foram transferidos para gaiolas entomológicas maiores (30 x 30 cm), proporcionando maior espaço de armazenamento, conseqüentemente aumentando o conforto das espécies. Após isso, foram mantidos no escuro por meio de um tecido preto que cobria a gaiola. Esse procedimento foi realizado para aclimatização dos insetos por uma hora até a realização dos bioensaios biológicos.

Impregnação das Garrafas

O inseticida utilizado nos bioensaios foi o piretróide deltametrina (C₂₂H₁₉Br₂NO₃) da BAYER, com grau de pureza de 99.6%. Foi pesado um total de 10,1 mg de inseticida grau técnico (em pó), o qual foi diluído em 1 ml de acetona (PA-Dinâmica) para preparação da solução mãe. Após isso, uma segunda solução foi preparada, a partir da solução mãe com uma concentração 0,5 mg/ml. Em seguida, foram preparadas as subdoses de 1,3,5,7,9,11 µg/garrafa para os experimentos Dose-Resposta (DR). Além disso, as garrafas também foram impregnadas com as doses de 21,9 µg/garrafa e 30 µg/garrafa para bioensaios Doses Diagnóstica (DD). A Dose Diagnóstica de 30 µg/garrafa foi preconizada por Delinger et al. (2016) para populações de *Lu. longipalpis* ao piretróide deltametrina. Essa dose foi determinada a partir de uma colônia de referência do Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR) e os bioensaios foram realizados na Universidade Estadual de Utah, localizada nos Estados Unidos. Frascos de vidro de 250 ml (Wheaton) foram impregnadas com 1 ml de deltametrina e os frascos controles com 1ml de acetona, identificados por nome do inseticida, concentração e data do teste. Todos os frascos foram impregnados uniformemente nas partes laterais, superior e inferior por meio de rotação do recipiente e observação criteriosa da impregnação. Após impregnação a

tampa foi retirada dos frascos para evitar condensação e as garrafas permaneceram destampadas para evaporação da acetona por um período de uma hora. Após a secagem de todos os frascos foram tampados e armazenados em caixas plásticas (29 litros) cobertas por um tecido preto para proteção da luz

Bioensaios de garrafas

Para o estudo foi utilizada a metodologia de bioensaios com garrafa do CDC, descrita pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2022b), com pequenas modificações. Para os experimentos de Dose Diagnóstica(DD) foram usadas as doses de 21,9 e 30 µg/garrafa e para bioensaios Doses Respostas (DR) concentrações de (1,3,5,7,9 e 11 µg/garrafa). Para cada garrafa foram expostos cerca de 20 flebotomíneos (♂♂ e ♀♀ misturados), provenientes do campo, as quais foram retirados das gaiolas com auxílio de um capturador de Castro.

Em seguida, os flebotomíneos eram introduzidos em cada garrafa com auxílio de um capturador de Castro e um funil pequeno registrando-se o minuto zero até completar 60 minutos de exposição. Primeiramente, foram introduzidos os flebotomíneos nas garrafas controle, as quais eram rapidamente fechadas e posicionadas horizontalmente. Para inserção dos flebotomíneos no grupo controle foi utilizado um capturador de Castro e um funil em separado para evitar contaminação das garrafas. A seguir, os flebotomíneos eram inseridos nas garrafas impregnadas com as DDs, onde foram usados um total de 15 garrafas, sendo 3 garrafas para o grupo controle e para cada dia de bioensaio era utilizado 4 garrafas por dia para cada DD. E para DRs foram utilizadas um total de 21 garrafas, sendo três garrafas para cada concentração. As garrafas do grupo controle foram impregnadas somente com acetona.

Para cada garrafa era registrado o tempo inicial e a mortalidade foi avaliada a cada 10 minutos, sendo que os flebotomíneos mortos e vivos foram anotados na Ficha de Bioensaios com Garrafas do CDC. Todas as garrafas

permaneciam cobertas com um pano preto para evitar o mínimo contato com a luz e eram descobertas, apenas para leitura de mortalidade. A leitura de mortalidade foi realizada após 24h. Foram realizados três bioensaios em diferentes dias.

Após isso, os flebotomíneos foram transferidos para potes plásticos de 250 ml com tela de proteção com algodão contendo solução açucarada a 10%. A leitura de mortalidade foi realizada em 24 horas por único pesquisador. Após a leitura os flebotomíneos foram armazenados em Eppendorf contendo álcool isopropílico para serem conservados até o momento da identificação em nível de espécie. Cada Eppendorf era identificado por dia do teste e município.

Identificação dos flebotomíneos

Os flebotomíneos foram transportados para o Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília para identificação taxonômica. Machos e fêmeas foram montados e clarificados, segundo Forattini (1973) e identificados utilizando a chave de Galati (2015). A abreviação dos gêneros seguiu a proposta de Marcondes (2007).

Critérios de mortalidade

Os flebotomíneos foram considerados mortos conforme critérios descritos por Rocha et al. (2023): i) incapacidade de voar de forma coordenada; quando imóvel; ii) não conseguiam ficar de pé; iii) poderiam ficar de pé e voar brevemente, mas caíam imediatamente.

Os critérios para avaliação de resistência foram obtidos de WHO (2022b) de acordo com: i) mortalidade de $\geq 98\%$ indica suscetibilidade; ii) mortalidade $\geq 90\%$ mas $< 98\%$ sugere possibilidade de resistência e iii) mortalidade menor que 90% sugere resistência estabelecida/confirmada.

Com as DL50 e DL95 estimadas para cada população foi calculada a RR50 e RR95 (Razão de Resistência). A resistência será determinada de

acordo com Mazzarri & Georghiou (1995) em resistência baixa, moderada ou alta para $RR < 5$, entre 5,0–10,0 e $> 10,0$, respectivamente.

Análise estatística

A taxa de mortalidade foi calculada somando o número de flebotomíneos mortos em todos os testes, expressos em porcentagem.

Os dados de mortalidade das populações de *Lu. longipalpis* foram utilizados para estimar a concentração que mata 50% (DL50) e 95% (DL95) e 99% (DL99) das amostras estudadas. O cálculo da DL50, DL95 e DL99 de cada população foi baseado na análise Probit (Lichfield & Wilcoxon 1949) e foi realizado pelo programa Basic Probit Analysis e Polo Plus (LeOra Software, 2002-2023). As doses letais foram expressas em microgramas por garrafa ($\mu\text{g/garrafa}$).

Também foi estimado o coeficiente angular da curva dose resposta (slope) por meio do programa GraphPad Prism versão 5.0 (Graph Pad Software, Boston, Massachusetts, USA). O slope representa a homogeneidade da população, indicando a progressão de resistência e variação genotípica na tolerância a um inseticida. De forma geral, os menores valores do coeficiente angular da curva indicam populações mais heterogêneas, conseqüentemente com maior probabilidade de seleção de resistência. A Razão de Resistência (RR) foi obtida por meio do quociente da DL50 da população de campo pela DL50 da linhagem suscetível. Quanto maior a Razão de Resistência, maior a magnitude da resistência da população ao inseticida.

Resultados

Um total de 4.094 flebotomíneos foram utilizados nos bioensaios de garrafas do CDC. *Lu. longipalpis* foi a espécie predominante em todas as

localidades (94%), seguida por seguidas por *Migonemyia migonei* (0,8%), *Evandromyia lenti* (0,6%), *Evandromyia sallesi* (0,3%) e *Nyssomyia whitmani* (0,1%).

A DL99 para população de referência de *Lu. longipalpis* foi 21,9 µg/garrafa e o tempo letal foi de 60 minutos de exposição para a dose de 11 µg/garrafa, a qual atingiu 100% de mortalidade. Para os experimentos de DD adotamos o valor de 1xDL99.

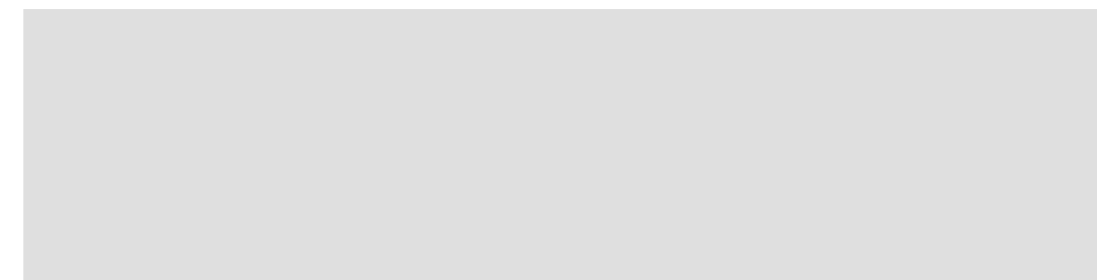
Bioensaios para DD de 21, 9 µg/garrafa demonstram que a maioria das populações de *Lu. longipalpis* procedentes dos municípios de Foz do Iguaçu/PR, Montes Claros/MG, Cavalcante/GO e Teresina/PI foram suscetíveis a deltametrina com taxa de mortalidade de 98,2%, 95,7%, 99,2% e 99,5%, respectivamente (Tabela 1). No entanto, a população de flebotomíneos oriunda de Caucaia/CE apresentou mortalidade de 87,1%, sugerindo resistência a deltametrina e a população de Fortaleza/CE demonstrou um valor de 94,9% de mortalidade quando expostos a deltametrina em bioensaios de garrafa, ou seja, possível resistência.

Para a DD de 30 µg/garrafa, as populações de flebotomíneos oriundas de Caucaia/CE e Teresina/PI apresentaram mortalidade de 95,5% e 95,8%, respectivamente. Esses valores sugerem possibilidade de resistência a deltametrina. Além disso, a população de Fortaleza/CE demonstrou um valor de 99,9% de mortalidade quando expostos a deltametrina. A população de Foz do Iguaçu/PR apresentou mortalidade de 98,7%. Dessa forma, ambas populações são suscetíveis. As populações de Montes Claros/MG e Cavalcante/GO também demonstraram suscetibilidade a deltametrina, com valores de taxa de mortalidade de 99,3% e 99,6%, respectivamente. Os dados apresentados podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 1. Taxa de mortalidade de populações de flebotomíneos expostos a DD de 21 µg/garrafa de deltametrina em bioensaios de garrafas do CDC, em 2023.

Mortalidade (%) após exposição com deltametrina (21,9 µg/garrafa)									
População	N	Tempo de exposição (min)							Classificação
		10	20	30	40	50	60	24hrs	
CAU	201	8,9	15,9	24,8	36,8	48,7	69,6	87,1	Resistência
FOR	219	6,8	13,2	21,9	30,1	55,3	64,8	94,9	Possível resistência
FOZ	166	4,2	11,4	27,7	51,2	68,1	85,5	98,2	Suscetível
MOC	163	14,1	25,1	54,6	87,7	92,1	100	95,7	Suscetível
CAV	247	14,1	30,7	85,8	93,9	96,3	99,1	99,2	Suscetível
TER	200	11,1	19,5	44,1	72,1	80,1	92,5	99,5	Suscetível

Tabela 2. Taxa de mortalidade de populações de flebotomíneos expostos a DD de 21 µg/garrafa de deltametrina em bioensaios de garrafas do CDC, em 2023.



Para bioensaios DR *Lu. longipalpis* procedente do município de Teresina/PI apresentou a menor mortalidade, cujo valor foi de 6,38%, na dose de 1 µg/garrafa. Por outro lado, as populações de Montes Claros/MG e Cavalcante/GO registraram maior taxa de mortalidade com valores de 18,6% e 16,8%, respectivamente.

Para a dose de 3 µg/garrafa a população de *Lu. longipalpis* oriunda de Cavalcante/GO apresentou a maior mortalidade (81,3%), quando comparada as demais populações, seguida de Montes Claros com 60,3%. As populações procedentes de Foz do Iguaçu/PR, Fortaleza/CE, Caucaia/CE e Teresina/PI obtiveram taxa de mortalidade entre 20 e 30%.

A dose de 5 µg/garrafa atingiu mortalidade de 100% para a população de *Lu. longipalpis* coletada no município de Cavalcante/GO. Esse nível de

mortalidade se manteve nas doses seguintes, demonstrando elevada suscetibilidade desta população a deltametrina. *Lu. longipalpis* de Montes Claros/MG obteve a segunda maior mortalidade para essa dose com 86,6%, enquanto que as demais populações variaram de 30 a 40% de mortalidade.

Registrou-se maior mortalidade (93,6%) para *Lu. longipalpis* procedente de Montes Claros/MG na dose de 7 µg/garrafa. Foz do Iguaçu/PR e Caucaíia/CE mantiveram uma média de 50% de mortalidade, enquanto que, Fortaleza/CE e Teresina/PI foram superiores a 60%.

Na dose de 9 µg/garrafa foi possível observar que a população de *Lu. longipalpis* coletada em Teresina/PI apresentou mortalidade superior a 90% e com Montes Claros/MG chegando a 100%. As populações de Fortaleza/CE, Caucaíia/CE e Foz do Iguaçu//PR apresentaram uma taxa de mortalidade entre variando entre 60 e 70%.

As populações de *Lu. longipalpis* de Cavalcante/GO e Montes Claros/MG atingiram 100% de mortalidade no tempo de 60 minutos, ou seja, estão muito próximas aos níveis de mortalidade da população suscetível (LRS) para a dose de 11 µg/garrafa. Porém, as populações de Foz do Iguaçu/PR, Fortaleza/CE, Caucaíia/CE e Teresina/PI, apresentaram taxa de mortalidade entre 86,5% a 96,2%. Todos esses resultados podem ser observados na Figura 2.

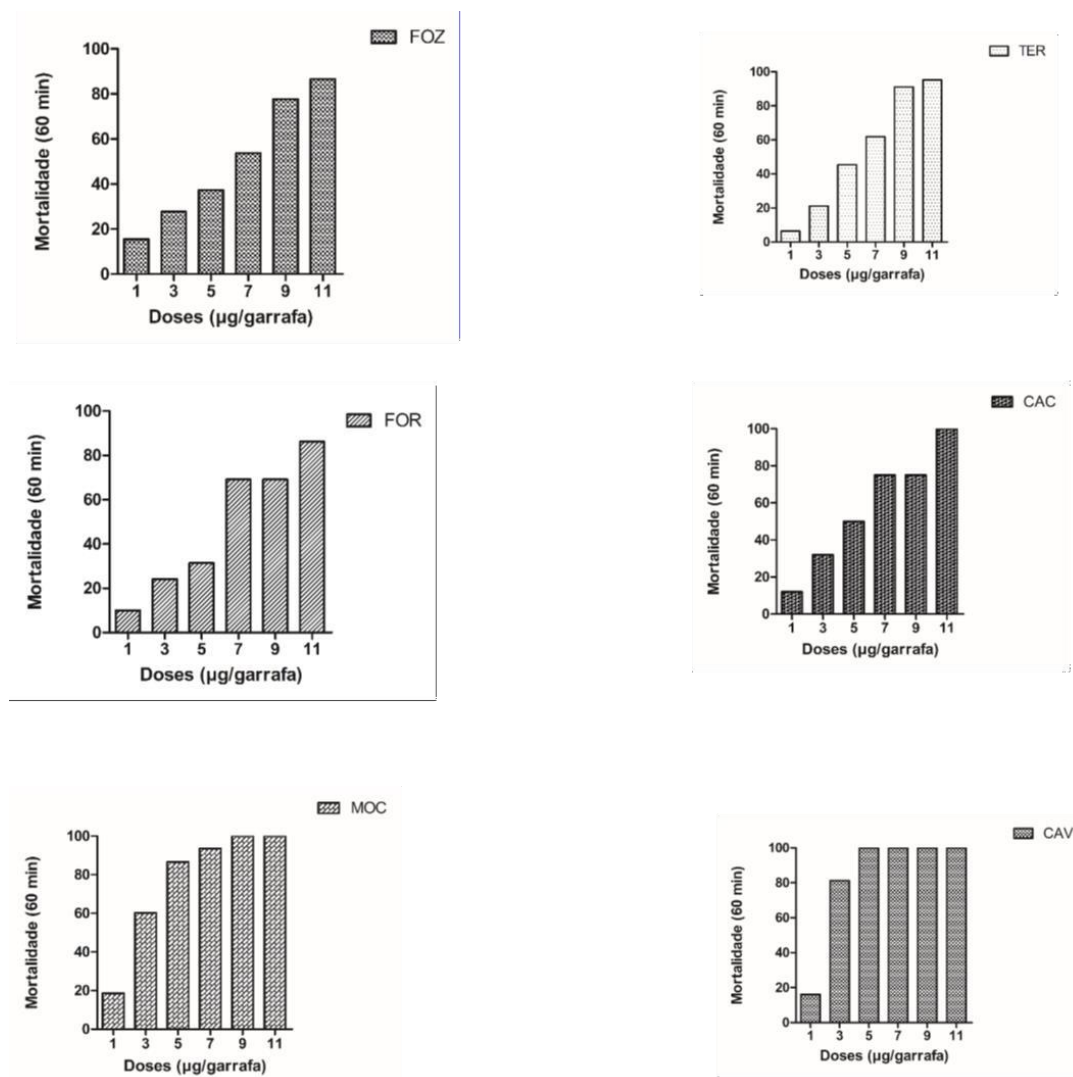


Figura 2. Média de mortalidade para doses respostas ao piretróide deltametrina com 60 min de exposição. (FOZ) População de Foz do Iguaçu/PR. (FOR) População de Fortaleza/CE. (CAU) População de Caucaia/CE. (TER) População de Teresina/PI. (MOC) Montes Claros/MG. (CAV) Cavalcante/GO.

A DL50 da população de referência foi de 3,50 µg/garrafa. As DL50 das populações de campo variaram entre 9,53 a 1,92 µg/garrafa. A população de *Lu. longipalpis* procedente de Caucaia/CE apresentou o maior valor de DL50 com 9,53 µg/garrafa, enquanto que a população de Cavalcante/GO obteve o menor valor que foi de 1,92 µg/garrafa. Nota-se que este valor foi menor que da LRS mencionada acima. As populações de *Lu. longipalpis* de Foz do

Iguaçu/PR e Caucaía/CE apresentaram diferenças significativas na DL50 quando comparadas com a população de referência (LRS), quando os limites de confiança foram sobrepostos ao nível de 95%, conforme mostra a Tabela 3.

A DL95 da população de referência foi de 12,8 µg/garrafa e a variação das DL95 das populações de campo foram de 53,6 a 4,33 µg/garrafa. As populações de *Lu. longipalpis* procedentes de Caucaía/CE e Fortaleza/CE obtiveram os maiores valores de DL95 com 53,6 µg/garrafa e 17,5 µg/garrafa, respectivamente. Observou-se que a população de Cavalcante/GO registrou o menor valor com 4,33 µg/garrafa, seguida de Montes Claros/MG (7,83) (Tabela 3). Não foi observada diferenças significativas na DL95 das populações de campo, quando os limites de confiança foram sobrepostos ao nível de 95%.

Os valores de RR50 apresentaram uma variação entre 2,27 a 0,54, demonstrando baixos níveis de resistência para as populações analisadas. *Lu. longipalpis* procedente de Caucaía/CE apresentou maior valor com 2,27 µg/garrafa. A RR50 da população de Foz do Iguaçu/PR foi de 2,03 µg/garrafa, seguida da população de Fortaleza/CE com um valor de 1,77. A população de Teresina/PI mostrou um valor de 1,54 µg/garrafa. Cavalcante/GO e Montes Claros/MG obtiveram os menores valores, com 0,54 µg/garrafa e 0,76 µg/garrafa, respectivamente.

Os menores valores de RR95 foram para as populações de Cavalcante/GO e Montes Claros/MG, com 0,33 e 0,61, respectivamente. *Lu. longipalpis* de Caucaía/CE apontou o maior valor de 4,18 µg/garrafa, seguida de Fortaleza/CE com 1,36 µg/garrafa. Para população de Foz do Iguaçu foi observado valor de 1,21. Teresina/PI teve sua RR95 estimada em 0,92 µg/garrafa. Esses valores podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3. Distribuição da população, número de exemplares por amostra, Slope, DL50, DL95, RR50 e RR95 de populações de *Lu. longipalpis* expostas ao piretróide deltametrina em bioensaios de garrafa do CDC, em 2023.

Estado	População	n	Slope	DL ₅₀ (IC 95%)	DL ₉₅ (IC 95%)	RR ₅₀	RR ₉₅
Bahia	LRS	420	2,93	3,50 (1,38-5,73)	12,8 (7,29-128,2)	-	-
Ceará	Caucáia	247	2,19	9,53 (7,09-36,1)	53,6 (20,9 -50,1)	2,27	4,18
Paraná	Foz do Iguaçu	325	4,86	7,12 (6,36-7,81)	15,5 (12,9-21,3)	2,03	1,21
Ceará	Fortaleza	337	3,64	6,21(4,75-8,03)	17,5 (9,59-36,2)	1,77	1,36
Piauí	Teresina	258	4,75	5,39 (4,73-5,98)	11,9 (10,2-15,4)	1,54	0,92
Minas Gerais	Montes Claros	279	3,53	2,67 (2,04-3,18)	7,80 (6,18-11,8)	0,76	0,61
Goiás	Cavalcante	328	4,66	1,92 (1,53-2,27)	4,33 (3,57-5,78)	0,54	0,33

Os valores do coeficiente angular das populações de flebotomíneos dos municípios de Teresina/PI (TER) e Caucaia/CE (CAU), mostrados nas Figuras 21, quando comparados à população de referência, apontaram menor homogeneidade e maior frequência de indivíduos com alelos de resistência, os quais podem ser selecionados futuramente, mediante forte pressão de inseticidas químicos. Por outro lado, *Lu. longipalpis* procedente de Foz do Iguaçu, mostrados na figura 3, demonstraram padrões de coeficiente angular similares a população de referência.

O coeficiente angular da população de *Lu. longipalpis* procedente de Cavalcante/GO apresentou perfil semelhante a população de referência (Figura 4). Populações de *Lu. longipalpis* procedentes de Fortaleza/CE e Montes Claros/MG possuem maior heterogeneidade, em relação a população de referência, portanto, sugerindo possibilidade de seleção de indivíduos resistentes, caso haja pressão de inseticidas.

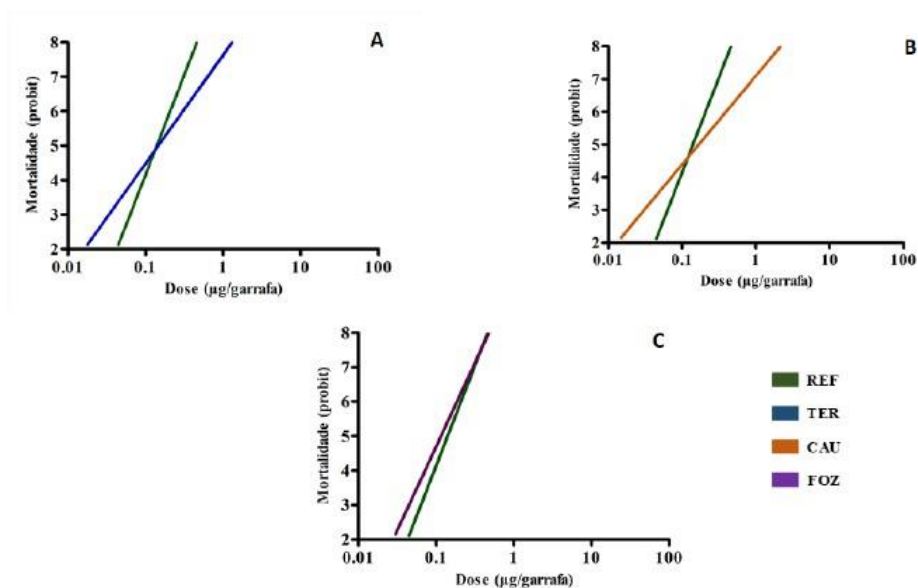


figura 3. Curva de mortalidade de populações de *Lu. longipalpis*, em escala logarítmica, para o inseticida deltametrina. A: comparação entre REF (5,81) e TER (3,15), B: comparação entre REF (5,81) e CAU (2,70), C: comparação entre REF (5,81) e FOZ (4,86).

REF: população de referência, TER: Teresina/PI, CAU: Caucaia/CE, FOZ: Foz do Iguaçú/PR.

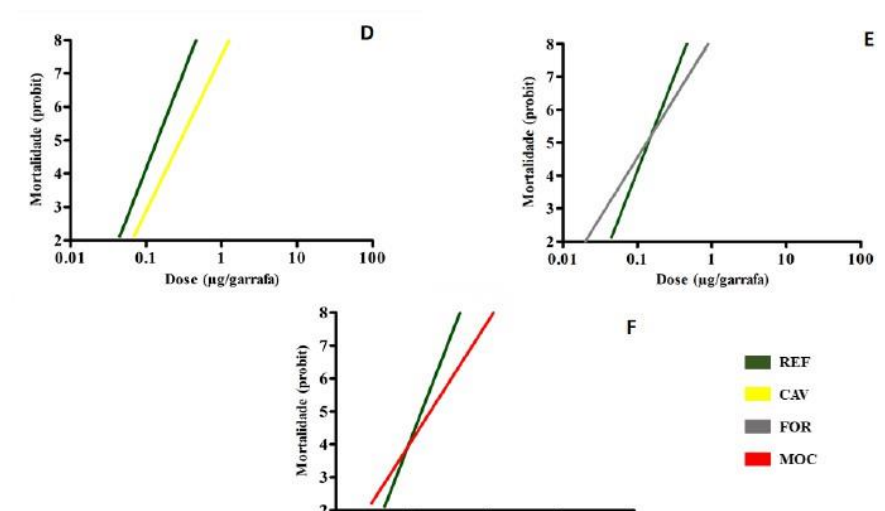


Figura 4. Curva de mortalidade de populações de *Lu. longipalpis*, em escala logarítmica, para o inseticida deltametrina. A: comparação entre REF (5,81) e

CAV (4,66), B: comparação entre REF (5,81) e FOR (3,64), C: comparação entre REF (5,81) e MOC (3,53).

REF: população de referência, CAV: Cavalcante/GO, FOR: Fortaleza/CE, MOC: Montes Claros/MG.

Discussão

O presente estudo estimou o perfil de suscetibilidade de seis populações de flebotomíneos coletados em áreas com uso de coleiras caninas para o controle da LV. A espécie de maior ocorrência em todos os municípios foi *Lu. longipalpis*, representando 94% (3.843). Rocha et al. (2020) que ao estudarem a suscetibilidade de *Lu. longipalpis* ao inseticida alfacipermetrina coletaram, em quatro municípios dos estados de Minas Gerais e Goiás, 88% de *Lu. longipalpis*, seguidas de *Lu. ischnacantha* (6%), *Lu. renei* (3%), *Nyssomyia whitmani* (1%), *Evandromyia lenti* (0.8%), *Micropygomyia villelai* (0.6%), *Ev. (Barrettomyia) série Cortelezzii* (0.2%), *Ev. bacula* (0.2%) e *Brumptomyia avellari* (0.2%).

Lu. longipalpis expostos na DD de 21,9 µg/garrafa e 30 µg/garrafa demonstrou elevada suscetibilidade para maioria das expostas a deltametrina. Singh et al. (2012) avaliaram o perfil de suscetibilidade do principal vetor da LV na Índia *Ph. argentipes*. Essa espécie foi suscetível para malation e deltametrina com mortalidade entre 98 e 100% e 98,4 e 100%, respectivamente. Zahra et al. (2021) também constataram mortalidade de 100% para *Ph. papatasi* para deltametrina e malation expostos em tubo da OMS.

Nesse estudo, a DD proposta por Derlinger et al. (2016) permitiu discriminar a população de *Lu. longipalpis* procedentes de Caucaia/CE como possível resistência. Roy et al. (2022) apontaram possibilidade de resistência para deltametrina em populações de *Ph. argentipes* coletadas nas localidades de Bishanpur, Madhepura e Pokhariya, no Nepal. A taxa de mortalidade variou entre 95,4% a 97,9% e a intensidade da resistência foi baixa, porém com

recomendação de uso de inseticidas com diferentes modos de ação, tais como organofosforados ou novos produtos pré qualificados pela OMS.

Nesta pesquisa, a DD foi de 21,9 µg/garrafa para LRS procedente da FIOCRUZ/RJ. Marceló et al. (2014), na Colômbia, determinaram a DD para *Lu. longipalpis* por meio de bioensaios de garrafa dos CDC. Esses pesquisadores utilizaram a DD de 10 µg/garrafa para deltametrina. Também na Colômbia, Santamaria et al. (2003) estimaram uma DD de 10 µg/garrafa para uma população de *Lu. longipalpis* criada em laboratório, expostas por 60 minutos. Portanto, destaca-se a importância de utilizar uma DD estimada a partir de uma população de referência local, conforme preconizada por Campos et al (2017).

Populações de Cavalcante/GO e Cuacáia/CE desde a concentração de 3 µg/garrafa até a maior que foi de 11 µg/garrafa, ocorreu grande mortalidade para ambas populações de campo, principalmente Cavalcante/GO que aos 30 minutos de exposição já apresentava mortalidade de 100% para as doses de 5, 7, 9 e 11 µg/garrafa, diferentemente da LRS que obteve 100% de mortalidade, apenas na dose de 11 µg/garrafa, após 60 minutos de exposição.

Os municípios de Montes Claros/MG e Cavalcante/GO tiveram menor pressão de inseticida, pois as coleiras foram implantadas em 05/2023 e 08/2023, respectivamente. O quantitativo de cães encoleirados foi de 419 em Montes Claros/MG e 359 em Cavalcante/GO. Dessa forma, a população de *Lu. longipalpis* coletada em Cavalcante/GO apresentou pouco tempo de exposição a inseticidas e foi coletada em ambiente mais preservado, pois localiza-se em área preservada da comunidade Kalunga do estado do Goiás. Tal fato, pode explicar a maior suscetibilidade desta população, podendo ser utilizada até como LRS para futuros estudos de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticidas.

Por outro lado, a implantação das coleiras impregnadas no município de Caucaia/CE iniciou-se em 04/2022, com um total de 675 cães encoleirados em dois ciclos. Fortaleza implantou as coleiras em 07/2021, com um

quantitativo de 122.467 cães utilizando coleiras. Esses dois municípios apresentaram menor taxa de mortalidade para espécie *Lu. longipalpis*. Esse fato, pode ter influenciado os resultados obtidos, uma vez que possuem maior tempo de pressão de inseticidas, tanto pelo uso das coleiras, quanto pelo tratamento residual, as quais utilizam inseticidas piretróides.

Nota-se que a população de *Lu. longipalpis* oriunda de Caucaia/CE foi classificada como resistente e possível resistente, quando exposta as DDs de 21,9 e 30 µg/garrafa, respectivamente. Ressalta-se que alguns pontos devem ser mencionados para interpretação desses resultados: i) fêmeas alimentadas de *Lu. longipalpis* apresentam maior mortalidade para alfacipemetrina em comparação com fêmeas não alimentadas (Rocha et al. 2023) e ii) o tempo de armazenamento das garrafas influencia a persistência do ingrediente ativo (Perea et al. 2009). Nesta pesquisa não houve a separação de fêmeas alimentadas das não alimentadas durante os bioensaios de garrafa do CDC e as garrafas permaneceram armazenadas por um período de 13 dias, excepcionalmente para os bioensaios com a população de Caucaia/CE. Dessa forma, duas hipóteses poderiam explicar este resultado. A primeira é a maior quantidade de fêmeas ingurgitadas e a segunda seria a perda da efetividade do ingrediente ativo, pois no terceiro dia de bioensaio, observou-se menor mortalidade entre os flebotomíneos expostos em todos os frascos.

Para mosquitos da espécie *Ae. aegypti* as garrafas impregnadas com cipermetrina podem ser utilizadas de 3 a 4 vezes, após 24 horas de armazenamento. Quando armazenadas no escuro e em temperatura ambiente perdem sua efetividade após o 14º dia, sendo necessária teste de efetividade para conduzir novos experimentos (Perea et al. 2009; Rodriguez et al. 2017). Futuros estudos tornam-se necessários para analisar a persistência de inseticidas em garrafas do CDC para estudos de suscetibilidade de flebotomíneos a inseticida.

Os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram com Bidabadi et al. (2022) que estimaram RR50 de 2,52 para a geração F1 da espécie

Phlebotomus papatasi em experimentos de suscetibilidade com tubos da OMS. As espécies foram suscetíveis para quatro inseticidas da classe dos piretróides.

Mazzari et al. (1997) encontraram menor suscetibilidade de *Lu. longipalpis* coletados em campo para DDT e malation, quando comparados com a LRS e as RR50 foram para deltametrina e permetrina apresentaram valores de 1,47 e 1,19, respectivamente. Com isso, foi observado para essa população de *Lu. longipalpis* baixos níveis de resistência para ambos inseticidas.

Maroli et al. (2002) estimaram a RR50 de duas espécies de flebotomíneos *Phlebotomus perniciosus* e *P. papatasi*. Os bioensaios com kits da OMS durante 60 minutos detectaram valores de RR50 para DDT, lambdacialotrina e permetrina de 1,19, 0,65 e 0,88 para *Ph. perniciosus* e 1,08, 1,51 e 1,41 para *P. papatasi*, respectivamente. Essas espécies foram suscetíveis aos inseticidas testados, em comparação com a população de referência.

Mazzari & Georghiou (1995) classificaram os níveis de resistência para mosquitos como baixa, moderada ou altamente resistente, conforme RR95 10. Os mosquitos apresentam fisiologia, comportamentos e tamanhos diferentes, quando comparados aos flebotomíneos. Assim, torna-se necessário definir com maior precisão os pontos de corte da RR para os flebotomíneos, pois não existe uma padronização dessas informações na literatura. Estudos com diversas populações de *Lu. longipalpis* de laboratório e de campo, realizados simultaneamente, poderiam auxiliar na padronização (Pessoa et al. 2015).

Um ponto importante é a padronização de uma LRS. *Lu. longipalpis* procedente da Gruta da Lapinha/MG foi sugerida como LRS em estudos de suscetibilidade com piretróides (Alexander et al. 2009, Pessoa et al. 2015). Neste estudo, sugerimos a população de *Lu. longipalpis* procedente de Cavalcante, como potencial LRS, uma vez que apresentou mortalidade de

100% na dose de 5 µg/garrafa e DL50=1,92 e DL95=4,95, ou seja, menor que a colônia utilizada neste estudo, com DL50=3,50 e DL95=12,8.

Normalmente, populações criadas e mantidas em colônia possuem dietas sanguíneas oferecidas com maior frequência e regularidade, melhores condições de abrigo e proteção e pouca influência da temperatura e humidade. Esses fatores podem explicar a maior tolerância a inseticidas de populações de colônia, em relação a populações de campo. Outro fator que poderia explicar a maior mortalidade nas populações de campo seria que durante a captura e transporte as amostras poderiam sofrer danos físicos ou estresse que aumentariam sua mortalidade (Rocha et al. 2021).

Gonzales et al. (2019) avaliaram o efeito a longo prazo da exposição de uma população de *Lu. longipalpis* aos inseticidas deltametrina (0,5%) e lambda-cialotrina (0,05%), durante um período de 30 meses no município Araçatuba, São Paulo, Brasil. Casas selecionadas no município foram randomizadas para receber um de três métodos de exposição a inseticidas: i) cães que receberam coleiras com 1g de deltametrina; ii) galinheiros pulverizados com lambda-cialotrina e iii) casas com grupo controle sem tratamento com inseticidas. *Lu. longipalpis* foi submetido a bioensaios com papel impregnado e demonstraram taxa de mortalidade 100% aos 60 minutos de exposição para ambos os inseticidas. Ademais, *Lu. longipalpis* de laboratório foi mais tolerante a deltametrina e lambdacialotrina, em comparação com as populações coletados em campo.

Conclusão

As DDs de 21,9 e 30 µg/garrafa comprovaram que as populações de *Lu. longipalpis* procedentes de Caucaia e Fortaleza, ambos no estado do Ceará apresentam-se com resistência e possível resistência. O monitoramento de resistência dessas populações deve ser realizado periodicamente ao longo do tempo, a fim de mapear a distribuição espacial da resistência para novas áreas e/ou populações.

A intensidade de resistência foi baixa para todas as populações, quando comparadas com a LRS. A padronização de uma LRS de *Lu. longipalpis* torna-se fundamental para futuros estudos com suscetibilidade de flebotomíneos aos inseticidas utilizados no seu controle.

As populações de *Lu. longipalpis* procedentes de Teresina/PI, Fortaleza/CE, Caucaia/CE e Montes Claros/MG são mais heterogêneas, portanto, possuem maior tendência para o surgimento de resistência. No entanto, *Lu. longipalpis* é um complexo de espécies crípticas e estudos moleculares devem ser realizados para determinar diferenças genéticas dessas populações e como elas afetam a tolerância de diferentes classes de inseticidas.

Referências

- Alexander B, Barros VC, de Souza SF, Barros SS, Teodoro LP, Soares ZR, Gontijo NF, Reithinger R. Susceptibility to chemical insecticides of two Brazilian populations of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Trop Med Int Health*. 2009;14(10):1272-1277.
- Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet*. 2018; 15;392(10151):951-970.
- Bidabadi L, Oshaghi MA, Enayati AA, Akhavan AA, Zahraei-Ramazani AR, Yaghoobi-Ershadi MR, Rassi Y, Aghaei-Afshar A, Koosha M, Arandian MH, Ghanei M, Ghassemi M, Vatandoost H. Molecular and Biochemical Detection of Insecticide Resistance in the Leishmania Vector, *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to Dichlorodiphenyltrichloroethane and Pyrethroids, in Central Iran. *J Med Entomol*. 2022;59(4):1347-1354.
- Campos KB, Martins AJ, Rodovalho CM, Bellinato DF, Dias LDS, Macoris MLDG, Andrighetti MTM, Lima JBP, Obara MT. 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. *Parasit Vectors*. 2020;13(1): 18-1.
- Costa DC, Bermudil PM, Rodas LC, Nunes MC, Hiramoto RM. Human visceral leishmaniasis and relationship with vector and canine control measures. *Ver. Saúde Pública*. 2018; (52): 11-1.
- Costa DNCC, Codeço CT, Bermudi PMM, Rodas LAC, Nunes CM, Hiramoto RM, Tolezano JE, Chiaravalloti Neto F. Control of canine visceral leishmaniasis

by euthanasia: estimated effect based on a survey and mathematical modeling. *Cad Saude Publica*. 2020;36(2):14-1.

Denlinger DS, Creswell JA, Anderson JL, Reese CK, Bernhardt SA. Diagnostic doses and times for *Phlebotomus papatasi* and *Lutzomyia longipalpis* sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) using the CDC bottle bioassay to assess insecticide resistance. *Parasit Vectors*. 2016;9 (212):11-1.

Franssen SU, Durrant C, Stark O, Moser B, Downing T, Imamura H, Dujardin JC, Sanders MJ, Mauricio I, Miles MA, Schnur LF, Jaffe CL, Nasereddin A, Schallig H, Yeo M, Bhattacharyya T, Alam MZ, Berriman M, Wirth T, Schönian G, Cotton JA. Global genome diversity of the *Leishmania donovani* complex. *Elife*. 2020; 25(9): 44-1.

Galati, EAB 2015. Apostila de bioecologia e identificação de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) – Departamento de Epidemiologia p. 127, Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, Brasil.

González, MA, Bell, MJ, Bernhardt, SA. Susceptibility of wildcaught *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sand flies to insecticide after an extended period of exposure in western São Paulo, Brazil. *Parasites Vectors* . 2019; 12(110): 9-1.

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

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(3):315-322.

Martins, IM, Silva JS, Campos DK, Oliveira R S, Silva PL, Carvalho S F, Antônio PC . Visceral leishmaniasis: historical series of hospitalized patients and correlation with climate in an endemic area in Minas Gerais, Brazil. *J Bras Patol Med Lab*. 2021; (57):7-1.

Marcondes, CB 2007. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomological News* 118: 351-356.

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

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

Neves LFC V, Rodas ACL, Cabral G, Pauliquévis JCR. Avaliação da eficácia Lambdacialotrina para o controle de *Lutzomyia longipalpis*. Bepa. 2007; 4(43):11-4.

Perea EZ, Balta León R, Palomino Salcedo M, Brogdon WG, Devine GJ. Adaptation and evaluation of the bottle assay for monitoring insecticide resistance in disease vector mosquitoes in the Peruvian Amazon. Malar J. 2009 Sep 3;8:208. doi: 10.1186/1475-2875-8-208. PMID: 19728871; PMCID: PMC2742550.

Pessoa GC, Lopes JV, Rocha MF, Pinheiro LC, Rosa AC, Michalsky ÉM, Dias ES. Baseline susceptibility to alpha-cypermethrin in *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) from Lapinha Cave (Brazil). Parasit Vectors. 2015; 17(8):8-1.

Roy L, Uranw S, Cloots K, Smekens T, Kiran U, Pyakurel UR, Das ML, S Yadav R, Van Bortel W. Susceptibility status of the wild-caught *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), the sand fly vector of visceral leishmaniasis, to different insecticides in Nepal. PLoS Negl Trop Dis. 2022; 16(7): 18-14.

Rocha DA, Andrade AJ, Moura LR, Figueiredo NG, Pessoa GCD, Obara MT. Susceptibility of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) collected in the field, to alpha-cypermethrin in four municipalities endemic to leishmaniasis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2020; 62(38): 4-1.

Rocha DA, Costa LMD, Pessoa GDC, Obara MT. Methods for detecting insecticide resistance in sand flies: A systematic review. Acta Trop. 2021.

Rocha DA, Costa LM, Pessoa GCD, Obara MT. Standardization of laboratory bioassays for the study of *Lutzomyia longipalpis* (diptera: psychodidae) susceptibility to pyrethroid insecticides. In: Oliveira, J, Alevi, KCC, Camargo, LM, Meneguetti, DUO (Eds.), Atualidades em medicina tropical no Brasil: Vetores. Strictu Sensu, Rio Branco, p. 137–153,2023.

Rodríguez MM, Crespo A, Hurtado D, Fuentes I, Rey J, Bisset JA. Diagnostic Doses of Insecticides for Adult *Aedes aegypti* to Assess Insecticide Resistance in Cuba. J Am Mosq Control Assoc. 33(2):142-144.

Scarpini S, Dondi A, Totaro C, Biagi C, Melchionda F, Zama D, Pierantoni L, Gennari M, Campagna C, Prete A, Lanari M. Visceral Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment Regimens in Different Geographical Areas with a Focus on Pediatrics. Microorganisms. 2022; 21;10(10):13-1.

Santamaría E, Munstermann LE, Ferro C. Aproximación al método CDC para determinar susceptibilidad a insecticidas en vectores de leishmaniasis [Approximation to the CDC method to determine insecticide susceptibility in leishmaniasis vectors]. Biomedica. 2003; 23(1):121-115.

Silva AB, Freitas FI, Mota C A, Maria EM, Campos HF, Lima CM. Analysis of the factors that influence the occurrence of human visceral leishmaniasis. *Cogit. Enferm.* 2021; (26):12-1.

Silva J D, Melo H M, Costa A.G, Costa D F, Silva B S, Melo, M A. Leishmaniose visceral em cães de assentamentos rurais. *Pesq Vet Bras.*2017; 73 (11):1292-1298.

Singh RK, Mittal PK, Dhiman RC. Insecticide susceptibility status of *Phlebotomus argentipes*, a vector of visceral leishmaniasis in different foci in three states of India. *J Vector Borne Dis.* 2012; 49(4):254-257.

WHO. World Health Organization. Determining discriminating concentrations of insecticides for monitoring resistance in sand flies: report of a multi-centre laboratory study and WHO expert consultations. Geneva: World Health Organization; Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, 2022a.

WHO. World Health Organization. Standard operating procedures for testing insecticide susceptibility of adult mosquitoes in WHO bottle bioassays. Geneva: World Health Organization; 2022b.

