

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

***Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*, Curry 1932: estudo de contaminação por bacilo
entomopatogênico em colônias mantidas em insetários**

por

FERNANDA OLIVEIRA REZENDE

Belo Horizonte

Fevereiro/ 2013

DISSERTAÇÃO MDIP – CPqRR

F. O. REZENDE

2013

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

***Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*, Curry 1932: Estudo de contaminação por bacilo
entomopatogênico em colônias mantidas em insetários**

por

FERNANDA OLIVEIRA REZENDE

Dissertação apresentada com vistas
à obtenção do Título de Mestre em
Ciências na área de concentração
Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Dra. Luzia Helena Carvalho
Co-orientação: Dr. Leon Rabinovitch

Belo Horizonte

Fevereiro/ 2013

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

O48a
2013

Rezende, Fernanda Oliveira.

Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis, Curry 1932:
Estudo de contaminação por bacilo entomopatogênico em
colônias mantidas em insetários / Fernanda Oliveira
Rezende. – Belo Horizonte, 2013.

xvi, 56 f.: il; 210 x 297mm.

Bibliografia: 64 - 72

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do
título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós -
Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas
René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e
Parasitárias.

1. Malária/transmissão 2. *Anopheles*/parasitologia
3. *Bacillus*/isolamento e purificação 4. Insetores
Vetores/crescimento & desenvolvimento I. *Anopheles*
(*Nyssorhynchus*) *aquasalis*, Curry 1932: Estudo de
contaminação por bacilo entomopatogênico em colônias
mantidas em insetários. II. Carvalho, Luzia Helena
(Orientação). III. Rabinovitch, Leon (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 2

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

***Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*, Curry 1932: Estudo de contaminação por bacilo
entomopatogênico em colônias mantidas em insetários**

por

FERNANDA OLIVEIRA REZENDE

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos membros:

Prof. Dra. Luzia Helena Carvalho (Presidente)

Prof. Dra. Adriana Marcos Vivoni

Prof. Dra. Paloma Helena Fernandes Shimabukuro

Suplente: Dr. Edelberto Santos Dias

Dissertação defendida e aprovada em: 27/02/2013.

A presente dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisa René Rachou/Fiocruz-MG, sob a orientação da Dra. Luzia Helena de Carvalho e no Laboratório de Fisiologia Bacteriana do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz-RJ, sob a co-orientação do Dr. Leon Rabinovitch, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/Fiocruz.

"A verdadeira maravilha da ciência não está em sua habilidade de explicar o Universo, mas na capacidade de formular novas questões."

Autor desconhecido

"Ainda que eu falasse a língua dos homens e falasse a língua dos anjos, sem amor eu nada seria"

Adapt.: 1 coríntios 13

DEDICATÓRIA

***Ao meu filho, Yuri, que me inspira a ser
sempre uma pessoa melhor.***

***Ao Fred, pela amizade, companheirismo,
paciência e apoio a todas as minhas
iniciativas.***

***À minha mãe, por seu exemplo de garra, força
e determinação.***

AGRADECIMENTOS

À Deus por abençoar minha caminhada.

À minha mãe por seus ensinamentos de vida e por ser meu maior exemplo.

Ao meu filho Yuri, por ser meu maior combustível nessa caminhada.

Ao meu grande companheiro, amigo e esposo Fred, que fez parte dessa trajetória trazendo sempre força e alegria.

A minha orientadora, Dra. Luzia, por ter me dado a oportunidade de fazer parte do grupo e do desenvolvimento desse trabalho com confiança, apoio, paciência e credibilidade.

Ao Dr. Leon Rabinovitch pela orientação, suporte, disposição e atenção dedicada à realização desse trabalho.

À Jeane Quintanilha pela enorme contribuição na identificação morfológica dos bacilos, apoio no desenvolvimento de experimentos no LFB e pelas dicas preciosas.

*Ao Dr. José Bento Pereira Lima e Dra. Denise Valle pelo fornecimento dos *Anopheles aquasalis*.*

À Dra. Dra. Márcia de Camargo Ranzani pelo envio das amostras da empresa BIOAGRI.

À Dra. Luciane Gomes Batista Pereira pelo envio das amostras do Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores da UFMG.

À Dra. Cristiane Brito, pelo suporte nos estudos de biologia molecular e pela disponibilidade, paciência, doçura, apoio e companheirismo.

Ao Dr. Luciano Moreira pelo suporte e por permitir o desenvolvimento desse trabalho no insetário.

À Alice por sua amizade e carinho, pela dedicação ao laboratório, por suas enormes contribuições e profissionalismo incontestável.

Ao Geraldo, por trazer sempre alegria e dar suporte a todos os trabalhos desenvolvidos no laboratório com paciência e alto astral.

*À todos meus amigos do insetário, Etiene, Heverton, Dani, Walison, Luke, Rayssa, Barbara e Fabiano, em especial à Carol Dantas pelo exemplo de profissionalismo e Ana Paula pelo apoio na colônia de *An. aquasalis*.*

À todos do Laboratório de Malária, que compartilham da companhia diária.

Ao meu grande amigo Fernando pela contribuição imprescindível e incondicional.

À minha amada amiga, Carina Margonari, por acompanhar minha caminhada sempre com palavras de incentivo e por fazer parte da minha vida.

À minha amiga, Beatriz Missagia e à sua aluna Lívia Barcelos pelas contribuições nos experimentos de teste de sanitizantes.

À Simone Freitas por me hospedar durante minha estadia no Rio de Janeiro.

Aos meus amigos do “Gourmet” pelos momentos de alegria e descontração que com certeza contribuíram para que a caminhada fosse mais leve, suave e “degustável”.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	XI
Lista de Tabelas	XII
Lista de Abreviaturas	XIV
Resumo	XVI
Abstract	XVII
1 Introdução	
1.1 Malária	17
1.2 Vetores da malária humana	19
1.3 Vetores Neotropicais	20
1.4 Ciclo de vida dos anofelinos	22
1.4.1 Ovo	22
1.4.2 Larva	23
1.4.3 Pupa	23
1.4.4 Adulto	23
1.5 Colonização de vetores em laboratórios de pesquisa	24
1.6 <i>Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis</i> , Curry 1932	26
1.7 Colonização laboratorial de <i>Anopheles aquasalis</i>	27
1.8 Bacilos entomopatogênicos	28
1.9 <i>Bacillus sphaericus</i>	30
1.10 Tipagem molecular e sorológica de <i>Bacillus</i> sp.	31
2 Justificativa	33
3 Objetivo Geral	34
3.1 Objetivos Específicos	34
4 Metodologia	35
4.1 Criação de <i>Anopheles aquasalis</i> no insetário do Laboratório de Malária do CPqRR	35
4.2 Monitoramento da produção de <i>Anopheles aquasalis</i>	36
4.3 Coleta das amostras de água para análise da presença de <i>Bacillus</i> sp.	36
4.3.1 Coleta de amostras no insetário do Laboratório de Malária do CPqRR	36
4.3.2 Coleta de amostras de outros insetários	37
4.4 Caracterização morfológica	37
4.5 Análise das colônias	38
4.6 Isolamento de <i>Bacillus</i> sp. da ração utilizada na alimentação das larvas	38
4.7 Isolamento de <i>Bacillus</i> sp. da ração utilizada como controle nos ensaios moleculares e biológicos	38
4.8 Detecção de genes codificadores de toxinas entomopatogênicas	39
4.9 Bioensaio qualitativo para estudo da toxicidade das estirpes de <i>Bacillus</i> sp. isoladas no estudo	40
5 Resultados	42
5.1 Monitoramento da colônia de <i>Anopheles aquasalis</i>	42
5.2 Características morfológicas das larvas mortas	43

5.3 Análise microbiológica das amostras de água utilizadas na criação dos mosquitos <i>An. aquasalis</i>	44
5.3.1 Análise macroscópica	44
5.3.2 Análise microscópica	44
5.4 Análise da presença de <i>Bacillus</i> sp. nas amostras coletadas	45
5.4.1 Amostras coletadas no insetário do Laboratório de Malária do CPqRR	45
5.4.2 Amostras coletadas em outros insetários	47
5.5 Isolamento de <i>Bacillus</i> sp. da ração utilizada na alimentação das larvas	48
5.6 PCR para identificação das toxinas	48
5.6.1 Resultado da padronização da reação de PCR	48
5.6.2 Padronização da quantidade de amostra	49
5.6.3 PCR para amplificar toxinas de <i>B. sphaericus</i> das amostras isoladas no Laboratório de Malária	50
5.6.4 PCR das amostras isoladas de outros insetários	51
5.7 Bioensaio qualitativo para estudo de toxicidade das estirpes isoladas	54
 6 Discussão	 56
 7 Conclusões	 62
 8 Anexos	 61
Anexo I: Licença CEUA: LW 49/2010	63
Anexo II: POP LAMAL-11 – Anexo II – Registro diário de pupas coletadas de <i>Anopheles aquasalis</i>	64
 9 Referências Bibliográficas	 65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Malária em 2010: as taxas de incidência e mortalidade por malária	18
Figura 2 Mapa apresentando a distribuição mundial de vetores anofelinos	20
Figura 3 Mapa apresentando a distribuição de vetores anofelinos nas Américas	22
Figura 4 Esquema do ciclo de vida dos culicídeos	24
Figura 5 Dados sobre o encontro de infecção natural de <i>Anopheles aquasalis</i> por <i>Plasmodium</i> spp. no Brasil	27
Figura 6 Ilustração do modo de ação da toxina Bin do <i>Bacillus sphaericus</i> em larvas de mosquito	31
Figura 7 Gaiola de criação dos <i>Anopheles aquasalis</i>	35
Figura 8 Esquema ilustrativo dos recipientes de armazenamento de água utilizadas na manutenção da colônia de <i>An. aquasalis</i>	36
Figura 9 Quantificação mensal de pupas de <i>Anopheles aquasalis</i> coletadas no insetário do Laboratório de Malária do CPqRR, período 2009 - 2011	43
Figura 10 Foto da larva de 4º estágio de <i>Anopheles aquasalis</i> com aspecto saudável (A) e com morfologia alterada pela ação de toxinas de <i>B. sphaericus</i> (B e C).	44
Figura 11 Foto ilustrativa da placa de cultura em meio ágar nutriente evidenciando as colônias sugestivas de bacilos entomopatogênicos (placa de 92 mm x 16 mm)	45
Figura 12 Foto ilustrativa de uma lâmina a fresco (A) e uma lâmina corada pelo método de Gram (B) (aumento de 1000x)	46
Figura 13 Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos da reação de PCR para amplificação dos genes das toxinas de <i>B. sphaericus</i> .	48
Figura 14 Eletroforese do produto da reação de PCR para padronização da quantidade de amostra utilizando a estirpe 2362.	49
Figura 15 Eletroforese em gel de agarose 2% do produto da reação em diferentes temperaturas utilizando a estirpe 2362	50
Figura 16 Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos PCR obtidos usando os pares de iniciadores para detecção dos genes que codificam as toxinas Bin A (100bp), Bin B (200bp), Mtx1 (300), Mtx2 (810bp) e Mtx3(400bp)	51
Figura 17 Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos da PCR obtidos usando os pares de iniciadores para detecção dos genes que codificam as toxinas: Bin A, Bin B, Mtx1, Mtx2, Mtx3	52
Figura 18 Placas de Agar com a cepa 2362, testadas com: 1) água Mili-G; 2) Álcool 70%; 3) Hipoclorito 1%; 4) Ácido peracético 1%; 5) ácido acético 10%.	52
Figura 19. Sensibilidade das estirpes de <i>Bacillus sphaericus</i> ao ácido peracético 1%	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na identificação dos genes das toxinas por PCR	39
Tabela 2	Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) das estirpes de <i>B. sphaericus</i> isoladas das amostras de água do Laboratório de Malária de 2009 à 2012	47
Tabela 3	Unidades formadoras de colônias (UFC)/mL das amostras de três insetários distintos	47
Tabela 4	Avaliação qualitativa da atividade biológica das estirpes de <i>Bacillus sphaericus</i> isoladas em larvas de <i>Anopheles aquasalis</i> de colônias de insetários brasileiros e o perfil de toxinas entomopatogênicas obtidos por PCR	54

LISTA DE ABREVIATURAS

- CDC – Centers for Disease Control and Prevention
- CEUA – Comitê de Ética para Uso de Animais
- Bc – *Bacillus cereus*
- Bin – Toxina binária de *Bacillus sphaericus*
- BS – *Bacillus sphaericus*
- Bt – *Bacillus thuringiensis*
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- dNTP – Deoxinucleotídeos trifosfatos
- L1 - Larvas de 1º estágio
- L2 – Larvas de 2º estágio
- L3 – Larvas de 3º estágio
- L4 – Larvas de 4º estágio
- LAMAL – Laboratório de Malária
- LFB – Laboratório de Fisiologia Bacteriana
- EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
- Kb – Kilobases
- M – Molar
- mM – Milimolar
- MO – Microscopia óptica
- Mtx – Toxina mosquitocida de *Bacillus sphaericus*
- NEG – Negativo
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- pb – pares de base
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- Pf – *Plasmodium falciparum*
- PM – Peso molecular
- PNCM – Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária
- POP – Procedimento Operacional Padrão
- SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde
- TAE – Tampão Tris-acetato EDTA, pH 8,0
- WHO – World Health Organization

RESUMO

REZENDE, Fernanda Oliveira. *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*, Curry 1932: Estudo de contaminação por bacilo entomopatogênico em colônias mantidas em insetários. Dissertação Mestrado – Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias. Belo Horizonte, 2013.

Os mosquitos da espécie *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*, Curry 1932 são vetores da malária humana nas Américas. Desde o ano de 2004, esse vetor tem sido mantido em colônia no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou (Lamal), Fiocruz-MG, onde tem sido utilizado para estudos de interação parasito-vetor. Na natureza, as larvas desses insetos desenvolvem-se em água salobra e, no insetário de criação do Lamal utiliza-se água do mar na proporção de 1:10 em água da torneira. No ano de 2008, observou-se uma queda significativa na produção de mosquitos da colônia, devido, principalmente, à mortalidade excessiva de larvas. As larvas, de 3º e 4º estádios, apresentavam características morfológicas semelhantes àquelas relacionadas com contaminação por bacilos entomopatogênicos. Como algumas bactérias do gênero *Bacillus* são patogênicas às larvas de mosquitos, o objetivo do presente trabalho foi identificar a (as) espécie (es) responsável (is) pela mortalidade das larvas de *Anopheles aquasalis*, bem como identificar as toxinas envolvidas nessa mortalidade. Através da caracterização morfológica e molecular foi possível identificar o *Bacillus sphaericus* como contaminante na colônia de criação de *Anopheles aquasalis*. Visando uma comparação inter-insetários, analisou-se ainda amostras de três insetários distintos, sendo a presença dos bacilos identificadas em dois desses. Pela técnica de PCR buscou-se amplificar as 5 toxinas mais frequentes das estirpes de *B. sphaericus* (BinA, BinB, Mtx1, Mtx2 e Mtx3), sendo que apenas 3 (família das MTxs) foram detectadas nas amostras estudadas. Os resultados dos ensaios biológicos confirmaram a toxicidade destas toxinas para as larvas de 3º e 4º estádios. Os ensaios biológicos realizados identificaram as estirpes isoladas do Laboratório de Malária como de alta toxicidade para o *Anopheles aquasalis*. Em resumo, este trabalho foi o primeiro a demonstrar a ocorrência de contaminação natural por bacilos entomopatogênicos em colônias de mosquitos mantidas em insetário e a caracterizar as toxinas envolvidas nesta contaminação. Espera-se que estes resultados possam contribuir para traçar estratégias de monitoramento e controle de contaminação em insetários de experimentação.

ABSTRACT

REZENDE, Fernanda Oliveira. *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*, Curry 1932: Study of contamination by entomopathogenic bacillus in colonies maintained in insectariums. Master's Degree Thesis – René Rachou Research Center. Area of concentration: Infectious and Parasitic Diseases. Belo Horizonte, 2013.

Mosquitoes of the species *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*, Curry 1932 are vectors of human malaria in the American continent. Since 2004, this vector has been kept in colony at the Malaria Laboratory in René Rachou Research Center (Lamal), Fiocruz-Minas, where it has been used for studies on vector-parasite interaction. In nature, these insects' larvae grow in brackish water and, in the creation insectarium of Lamal sea water is used in the proportion 1:10 in tap water. In 2008, a significant decrease was observed in the production of mosquitoes of the colony, mostly due to the excessive mortality of larvae. These larvae, from 3rd and 4th stage, showed morphologic characteristics similar to those related to contamination by entomopathogenic bacillus. As some bacteria from genus *Bacillus* are pathogenic to mosquitoes' larvae, the purpose of the present work was to identify the species responsible for the mortality of *Anopheles aquasalis* larvae, as well as identify the toxins included in this mortality. Through morphologic and molecular characterization, it was possible to identify *Bacillus sphaericus* as contaminant in the creation colony of *Anopheles aquasalis*. Seeking an inter-insectariums comparison, samples of three distinct insectariums were still analyzed, and the presence of *Bacillus sphaericus* was identified in two of them. Using the technique of PCR, an amplification of the 5 most frequent in the lineage of *B. sphaericus* (BinA, BinB, Mtx1, Mtx2 e Mtx3) was tried, with only 3 (MTxs families) being identified in the studied samples. The results of biologic trials confirmed the toxicity of these toxins for larvae in 3rd and 4th stage. In addition, the biologic trials identified the isolated lineages of the Malaria Laboratory as of high toxicity for *Anopheles aquasalis*. In short, this is a pioneer work, since it was the first to show the occurrence of natural contamination by entomopathogenic bacillus in colonies of mosquitoes maintained in insectariums and to characterize the toxins involved in this contamination. It is expected that these results might contribute to trace strategies in order to monitor and control contamination in experimentation insectariums.

1. Introdução

1.1 Malária

A malária ocorre principalmente em áreas pobres tropicais e subtropicais do mundo, e em muitos dos países afetados pela malária, a doença é uma das principais causas de morte. Segundo o Relatório Mundial de Malária (2011), essa enfermidade é prevalente em 106 países do mundo, com 35 países da África Central responsáveis pelo maior número de casos e óbitos (WHO, 2011). Em comparação com o século anterior, a área de risco de malária reduziu de 53% para 27% da superfície terrestre, sendo que o número de países expostos ao de risco da doença também caiu de 140 para 106 (Figura 1).

A transmissão da malária nas áreas endêmicas está relacionada a diversos fatores como: existência do parasito, do vetor, e de pessoas susceptíveis; grandes coleções hídricas; alto índice pluviométrico; modificações antrópicas como o desmatamento; construção de hidroelétricas, estradas, entre outros; fatores econômicos e sociais (tipo de habitação e o hábito de trabalho) (MS, 2008). Na série temporal brasileira, de 1960 até 1976, foram registrados menos de 100 mil casos de malária por ano. A partir desse período, houve forte tendência na elevação da doença em função da ocupação desordenada da região amazônica, culminando no ano de 1999, com o registro de 635.646 casos. Este incremento deveu-se principalmente ao processo de colonização e às atividades de mineração sem a infraestrutura de saúde para atender a população (Oliveira-Ferreira et al., 2010). Nesse mesmo ano, em 1999, o governo decidiu implementar um plano para controlar a malária denominado - Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária. O novo plano teve como objetivos principais: reduzir a incidência da malária, a morbidade (incluindo as formas graves da doença) e a mortalidade (Oliveira-Ferreira et al., 2010). No ano seguinte foram registrados mais de 611 mil casos da doença no Brasil, sendo 99,4% destes procedentes da Amazônia Legal (SVS, 2007). A presença de florestas tropicais, condições socioculturais da população (hábitos de vida, atividade agrícola, tipo de residência) e movimentos migratórios foram fatores que contribuíram e contribuem para manutenção desta endemia na Amazônia (Martens and Hall, 2000).

O aumento súbito da transmissão da malária ocorreu novamente em algumas localidades da Amazônia e a incidência voltou a aumentar entre 2003 e 2005, levando os números comparáveis aos registrados em 1999. As razões desse aumento também se deveram principalmente à ocupação desordenada no entorno das grandes cidades da região (incluindo a

instalação de assentamentos clandestinos) e aos projetos de reforma agrária, que levaram ao desmatamento para extração de madeira, pecuária de gado e agricultura, aumentando assim o número de criadouros e facilitando o contato com o mosquito transmissor (Oliveira-Ferreira et al., 2010).

Após esforços o Ministério da Saúde, através da mobilização multissetorial de forças (principalmente gestores de saúde nos estados e municípios da região amazônica), para coordenar os movimentos de população e priorizar a prevenção, vigilância e controle da malária em suas agendas, houve uma redução significativa na transmissão e notificação de casos que continua a diminuir a cada ano, alcançando em 2012 os menores índices dos últimos 30 anos (SVS, 2012). Ainda assim, atualmente são registrados no país mais de 200 mil casos de malária por ano, sendo que 99,8% destes ocorrem na Amazônia Legal (SVS, 2012). De fato, só no ano de 2012 foram registrados 200.496 casos autóctones de malária, sendo 25.267 (12,6 %) destes causados pelo *Plasmodium falciparum*, Welch, 1897, 174.929 (87,2 %) por *Plasmodium vivax*, Grassi & Feletti, 1890, 2.945 (1,46%) de malária mista (*P. vivax* e *P. falciparum*) e 74 (0,03%) casos por *Plasmodium malariae*, Laveran, 1881 (SVS, 2012).

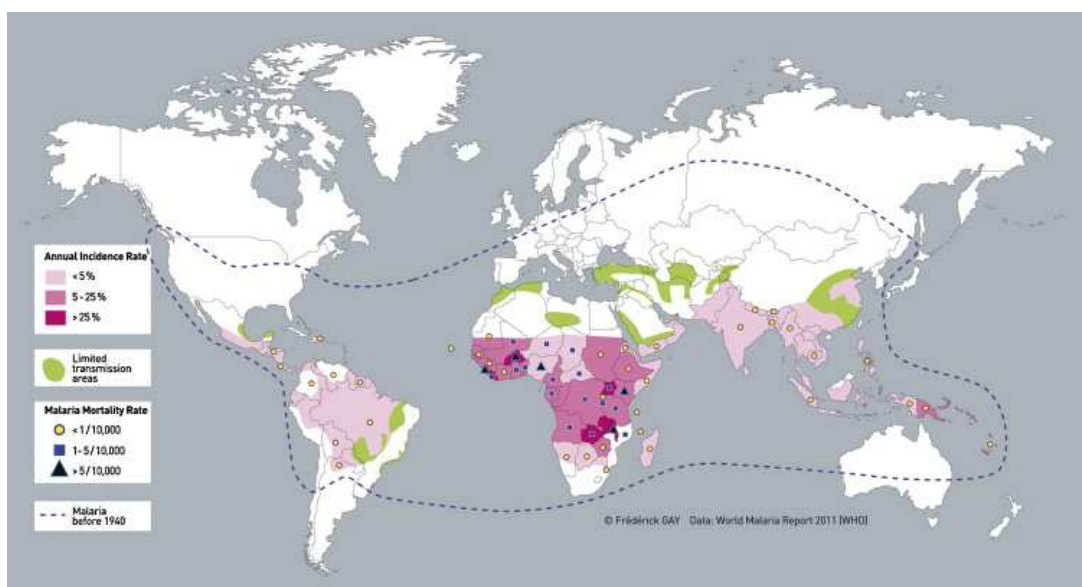


Figura 1. Malária em 2010: as taxas de incidência e mortalidade por malária. Taxa de incidência anual: [Número de casos de malária prováveis ou confirmados / população em risco] $\times$ 100. Taxa de Mortalidade Malária: [Número de mortes atribuídas a malária / População em risco] $\times$ 100. Taxa de Mortalidade Malária: [Número de mortes atribuídas a malária / População em risco] $\times$ 10.000. Fonte: Relatório Mundial de Malária, 2011 (OMS)

1.2 Vetores da malária humana

Todos os vetores da malária humana são insetos da ordem Diptera, pertencentes à família Culicidae, subfamília Anophelinae e gênero *Anopheles*. Os locais de reprodução de mosquitos infectados variam muito com relação à espécie. Alguns preferem água limpa, habitando as margens de córregos, enquanto outras prosperam em valas de irrigação e reservatórios. Algumas espécies exigem extensa cobertura vegetal, preferindo pântanos e outras coleções permanentes de água carregada de matéria orgânica dissolvida (Consoli & Oliveira, 1994; Forattini, 2002). Já foram descritas mais de 300 espécies de *Anopheles*, sendo que 60 espécies são consideradas importantes vetores de malária (figura 2). Alguns dos fatos que influenciam a capacidade vetorial são: (i) habilidade de se alimentar em hospedeiros vertebrados suscetíveis; (ii) longevidade; (iii) suscetibilidade à infecção pelo parasita da malária; (iv) local de proliferação do mosquito (Despommier, 2005).

As relações entre as zonas ecológicas e a frequência das espécies de *Anopheles* em uma pequena área geográfica são desconhecidas. Além de fatores climáticos e da flora e fauna regionais, os fatores que afetam a alimentação, oviposição e sobrevivência de uma espécie, além das perturbações ecológicas como resultado direto da atividade humana, também podem aumentar o número de criadouros. Assim, cada mudança ambiental no habitat do mosquito pode ocorrer como resultado de um processo natural ou por intervenção humana, reorganizando a paisagem ecológica e levando a adaptação dos hábitos dos vetores. Cada espécie de *Anopheles* ocupa um nicho ecológico específico que é determinado geneticamente e combinado às mudanças de temperatura, umidade, altitude, densidade populacional dos seres humanos, e desmatamento. Esses são apenas alguns dos fatores ecológicos essenciais na transmissão da malária (Despommier, 2005).

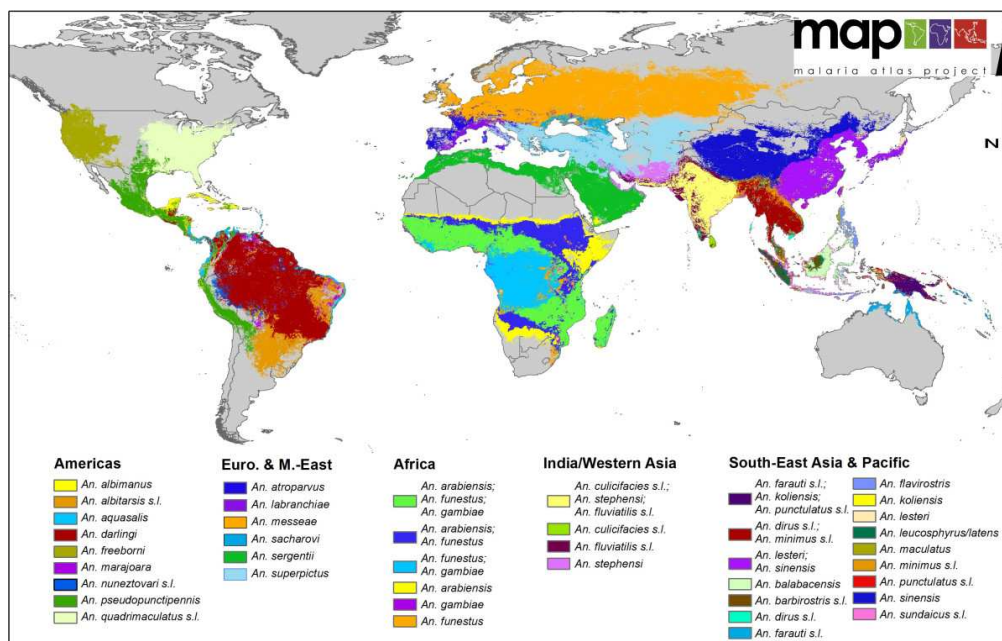


Figura 2. Mapa apresentando a distribuição mundial de vetores anofelinos.

Fonte: Sinka, *et al.*, 2010.

1.3 Vetores Neotropicais

Nos trópicos, criadouros de mosquitos surgem também devido à construção de barragens e canais, de estradas, fazendas de mineração, assentamentos humanos, represamento para usina hidrelétrica, agricultura e pecuária. Muitos destes locais se desenvolvem em zonas de transmissão devido ao aumento concomitante das populações humanas que se deslocam para essas áreas. A diversidade desses criadouros e da biologia das espécies envolvidas na transmissão da malária reflete a dificuldade em encontrar uma solução comum para o controle da transmissão (Sinka et al., 2010).

No Brasil, o aumento da população de mosquitos vetores resultou de um manejo inadequado do meio ambiente. Um exemplo são os tanques abandonados utilizados para piscicultura nos quintais de casas ou na periferia de várias cidades da região amazônica, como em Manaus, onde esta atividade era comum (Saraiva et al., 2009). Além disso, uma das mudanças mais drásticas que afetam as populações de mosquitos é o desmatamento. Quando a floresta é limpa, a erosão do solo ocorre, arrancando nutrientes. Nesse processo, a floresta tropical é tipicamente convertida em pastagens, terrenos agrícolas e assentamentos humanos. Estes distúrbios ecológicos permitem a proliferação de mosquitos que preferem a habitação humana a ambientes naturais (Despommier, 2005). A malária na Amazônia, assim como em outras regiões tropicais, sofre variações com as estações do ano. Nessas regiões a temperatura

é praticamente estável, mas os índices de umidade variam conforme a época do ano. A frequência das chuvas influencia o regime hidrológico da região, já que o período de chuvas leva ao aumento do nível dos rios. Nos períodos de estiagem, as águas recuam deixando poças de água que servem como verdadeiros criadouros de mosquitos. Assim, o ritmo de propagação da malária se dá de acordo com as chuvas (Galardo et al., 2009; Girod et al., 2011).

As espécies de importância médica encontradas na região neotropical estão incluídas nos subgêneros *Anopheles*, *Kerteszia* e *Nyssorhynchus* (Rosa-Freitas et al., 1998), sendo que no Brasil, somente os dois últimos tem importância na transmissão da malária. Os anofelinos do subgênero *Kerteszia* são mosquitos silvestres que desovam na água que se acumula geralmente na base das folhas de gravatás. Tiveram grande importância na transmissão da malária nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, na década de 1940, quando a doença foi considerada endêmica. Apesar de a endemia ter sido controlada, mesmo com as medidas adotadas nas décadas de 60 e 70, que incluíam destruição de bromélias e aplicação de larvicidas e inseticidas nas matas, as espécies do subgênero foram capazes de persistir na região (Ueno et al., 2007). Assim, ainda hoje as espécies *Anopheles bellator* Dyar e Knab, 1906 e *Anopheles cruzii* Dyar e Knab, 1903, são exemplos de vetores importantes de malária deste subgênero, principalmente nas regiões de mata atlântica (Figura 3).

O subgênero *Nyssorhynchus* constitui o grupo de anofelinos com maior número de vetores de malária na região neotropical. A espécie *Anopheles darlingi* Root, 1926 é o principal vetor da malária no Brasil e está presente em quase todo o território nacional (Figura 3). É um mosquito que se adapta facilmente e se beneficia das modificações antrópicas do ambiente silvestre e mesmo em baixas densidades é capaz de transmitir o parasito. De um modo geral, este anofelino tem comportamento endofílico, endofágico e antropofílico (Sinka et al., 2010).

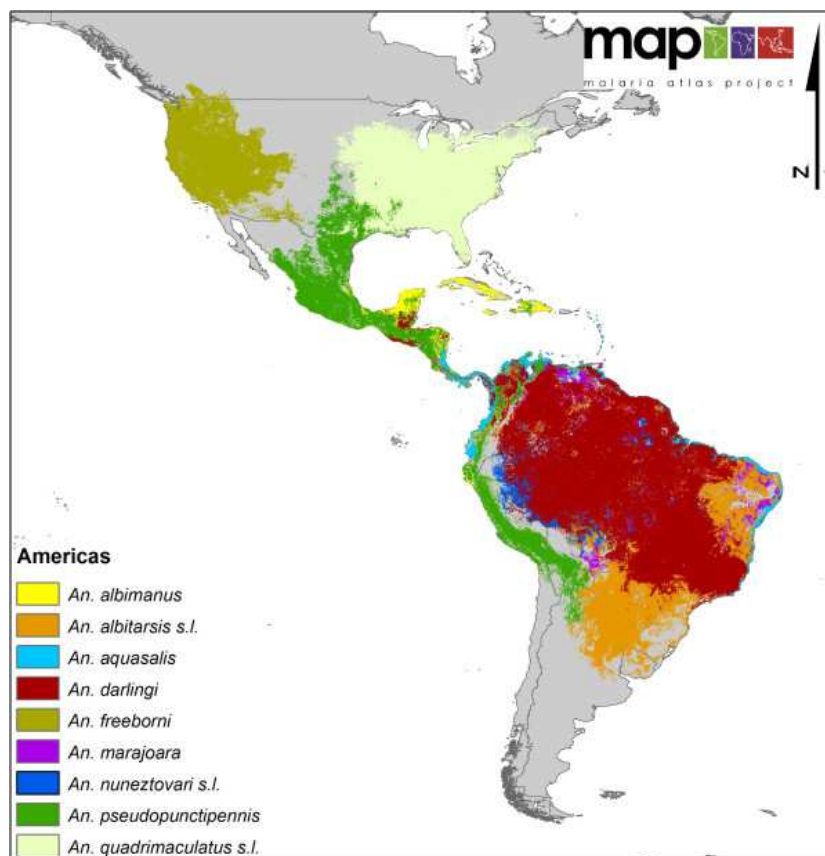


Figura 3. Mapa apresentando a distribuição de vetores anofelinos nas Américas.

Fonte: Sinka, *et al.*, 2010.

1.4 Ciclo de vida dos anofelinos

Os anofelinos são insetos holometábulos, isto é, apresentam metamorfose completa em seu ciclo evolutivo. Desse modo, apresentam como qualquer culicídeo, duas fases no seu ciclo de vida: a aquática, que inclui três estágios de desenvolvimento: ovo, larva (quatro estádios larvais) e pupa e a terrestre, que corresponde ao mosquito adulto (Figura 4).

1.4.1 Ovos

Os ovos dos anofelinos são postos na lâmina d'água e possuem aspecto alongado e simetria bilateral. Seus flutuadores laterais permitem que os mesmos se desloquem para as margens (Consoli & Oliveira, 1994). O número de ovos depositados em cada postura varia de acordo com a espécie, mas em média são de 75 a 150 ovos. O tempo de eclosão varia de 2 a 3 dias, dependendo da temperatura (Forattini, 1973; Oliveira-Ferreira *et al.*, 1992). Esses também não resistem a dessecação exceto de algumas espécies que resistem a dessecação em solos úmidos (Forattini, 1973).

1.4.2 Larvas

As larvas dos mosquitos anofelinos são semelhantes às dos demais culicídeos, com os dois primeiros tagmas bastante globosos e o abdome semicilíndrico com oito segmentos (Consoli and Oliveira, 1994; Fleming, 1992; G., 1992). Em geral, elas precisam de sete a dez dias para o desenvolvimento, mas isso pode variar de acordo com a espécie, fatores abióticos (temperatura, luz, salinidade) e bióticos (vegetais, predadores, disponibilidade de alimentos) (Consoli and Oliveira, 1994). Diferente dos outros culicíneos, os anofelinos não possuem sifão respiratório posterior, esse é substituído por um aparelho espiracular localizado dorsalmente (Forattini, 2002). As larvas são facilmente reconhecidas por sua posição de repouso, paralela à superfície da água (Fleming, 1992). Seus habitats são variados e as espécies neotropicais usam água não contaminada como lagoas, lagos e margens de corpos d'água. Os micro-habitats são formados por vegetação flutuante ou emergente, como algas, e entre detritos flutuantes (Fleming, 1992; Forattini, 2002; Forattini, 1973).

1.4.3 Pupas

A fase de pupa em anofelinos pode durar de 1 a 3 dias dependendo da espécie, as pupas não se alimentam e precisam entrar em contato com a superfície da água para respirarem devido a posição das trombetas respiratórias, que se projetam para cima a partir do tórax (Consoli and Oliveira, 1994; Forattini, 2002; Forattini, 1973). Das pupas emergem os adultos e é nesta fase que ocorre o maior processo de metamorfose, ao qual deixam de ser aquáticas para se tornarem aladas. As pupas dos machos são um pouco menores que as das fêmeas e os machos adultos emergem antes que as fêmeas (Fleming, 1992).

1.4.4 Adultos

O corpo dos adultos é nitidamente dividido em cabeça, tórax e abdome. Na cabeça encontram-se os principais órgãos dos sentidos, como os olhos, as antenas e os palpos. No tórax estão os apêndices especializados na locomoção, isto é, as pernas e as asas. O abdome abriga a maior parte dos órgãos internos, como o aparelho reprodutor, digestivo e excretor (Forattini, 2002). Machos e fêmeas se alimentam de néctar e frutos danificados. Mas só a fêmea se alimenta de sangue animal para fornecer proteínas para os seus ovos. O mosquito adulto sobrevive até um mês e acasala normalmente durante o voo. O macho é atraído pela

fêmea utilizando suas antenas que atuam como receptores de som e o reconhecimento espécie-específico se dá pelo som de seu bater de asas. Após a cópula, a fêmea alça vôo a procura de sangue através de estímulos sensoriais, tais como odor, o dióxido de carbono e correntes de convecção. Após a realização do repasto sanguíneo ela então procura um lugar de repouso que pode ser próximo ao local do repasto ou distante, podendo apresentar comportamento endofílico (repousam dentro das casas após hematofagia) ou exofílico (repousam fora das casas após a hematofagia). As proteínas presentes no sangue auxiliam na maturação dos ovários e desenvolvimento dos ovos. A oviposição geralmente ocorre no período noturno (Forattini, 2002).

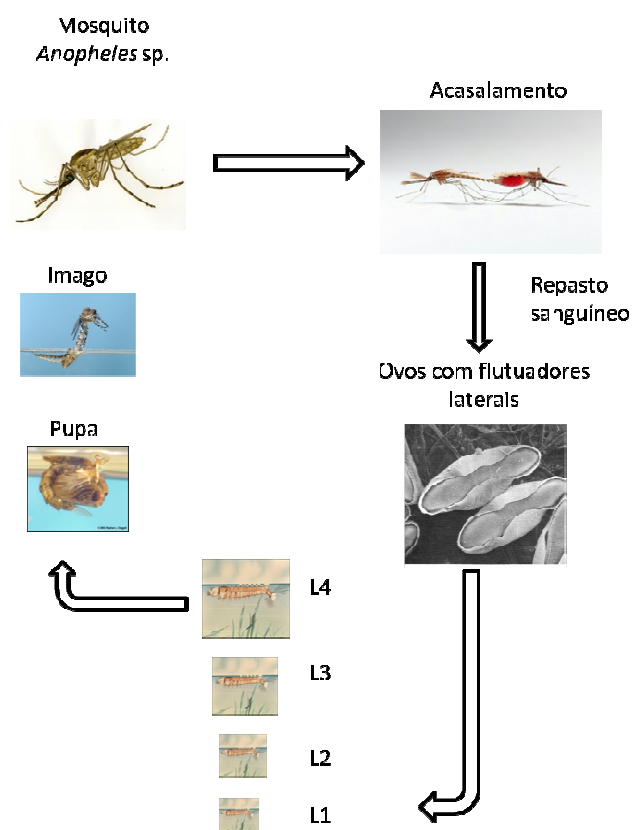


Figura 4. Esquema do ciclo de vida dos culicídeos

1.5 Colonização de vetores em laboratórios de pesquisas

Em várias partes do mundo, laboratórios têm estabelecido colônias de anofelinos com o intuito de estudar a biologia, o comportamento e ecologia de espécies envolvidas na dinâmica de transmissão de doenças, bem como medidas de controle de vetores e de parasitos.

No entanto, algumas colônias de anofelinos são mantidas por meio de um sistema de cópula induzida, o que acarreta em dificuldades de manutenção em condições de laboratório (Arruda et al., 1982). Por outro lado, há algumas espécies que estão completamente adaptadas à criação em sistema fechado. Neste sistema, os mosquitos estão sujeitos à reprodução, cópula e sucessão de gerações em colônias de insetário. Algumas espécies do gênero *Anopheles* são exemplos clássicos deste sistema fechado, como *Anopheles arabiensis* Patton, 1905, *An. dirus* Peyton & Harrison, 1979, *An. freeborn* Aitken, 1939, *An. gambiae* Giles, 1926, *An. sacharovi* Favre, 1903 e *An. stephensi* Liston, 1901 (Diop et al., 1998; Hunt and Gunders, 1990; Liu et al., 1987; MOORES, 1953; Mpofu et al., 1993). Sob tais condições, estas espécies podem também ser avaliadas quanto a susceptibilidade à infecção por *Plasmodium* assim como aos inseticidas (Davis, 1994; Zerpa et al., 1998). Estudos também têm sido direcionados ao controle biológico desses importantes vetores além do conhecimento sobre sua biologia.

As primeiras tentativas de iniciar uma colônia de *Anopheles gambiae* foram realizadas na Unidade de Pesquisa de Agrotóxicos Colônial em Arusha, Tanganyika, no início de 1955 (SHUTE, 1956). O objetivo da colônia era fornecer uma fonte de mosquitos que poderiam ser usados para testes de inseticidas em conexão com uma pesquisa sobre a suscetibilidade do *A. Gambiae* à esses compostos, na África Oriental (Armstrong, 1958; SHUTE, 1956). Coluzzi, em 1964, relatou o sucesso da criação em massa de sete espécies de *Anopheles*, no Istituto di Malariologia "Ettore Marchiafava", Stazione Sperimentale di Entomologia Medica e Veterinaria, Monticelli, Frosinone, Italia. Dentre as espécies colonizadas estavam, *An. gambiae* (principal vetor de malária na África) e *An. stephensi* (vetor na Ásia). Já com vetores neotropicais, a primeira tentativa de colonização do *An. darlingi* (principal vetor da malária no Brasil) foi realizada por Gigioli em 1947, na região das Guianas, no norte da América do Sul. Já em 1988, Buralli & Bergo descrevem a instalação e manutenção inicial dessa mesma espécie de anofelino no município de Araraquara, SP, como parte do programa de pesquisas em malária da Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN (Bergo et al., 1990; Buralli and Bergo, 1988; GIGIOLI, 1947). No entanto, até hoje não foi possível a colonização desse vetor por cópula livre.

Apesar da importância dos anofelinos na transmissão de malária e das dificuldades enfrentadas para o controle desses vetores no campo, sua criação em sistema fechado é bastante complexa e envolvem diferentes necessidades e dificuldades (COLUZZI, 1964; Singh et al., 2004). Particularmente, vetores sul-americanos da malária são notoriamente

difíceis de reproduzirem-se em sistema fechado. A principal dificuldade na colonização desses mosquitos reside na sua incapacidade quase completa para acasalar em condições artificiais (Lima et al., 2004). Duas das poucas espécies da América do Sul que tem se adaptado com sucesso para condições de laboratório são: o *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* Lynch-Arribálzaga, 1878 (Horosko et al., 1997), e o *An. aquasalis* Curry, 1932 (Da Silva et al., 2006).

Atualmente, vetores colonizados servem como ferramenta para estudos cada vez mais amplos, incluindo a criação de diversas linhagens – (suscetíveis ou refratárias às infecções, transgênicas, *knockout* ou transfectadas com microrganismos bloqueadores da infecção) – para estudos relacionados à imunologia de vetores e interação com patógenos, objetivando a aplicação dessas estratégias no campo para o bloqueio de transmissão de diversos patógenos (Blandin et al., 2002; Moreira et al., 2002; Moreira et al., 2009; Wang et al., 2012).

1.6 – *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*, Curry 1932

Os mosquitos da espécie *Anopheles aquasalis* são importantes vetores da malária na região costeira, distribuindo-se do norte da Nicarágua até o sul do Brasil, na costa atlântica e no Equador, na costa do Pacífico (Faran, 1980; Rubio-Palis and Zimmerman, 1997) (Figura 3). A distribuição desse vetor está relacionada ao hábito de se desenvolverem naturalmente em ambientes ensolarados, em água salobra, limpa e fresca e com vegetação emergente, como manguezais, lagoas e represas e canais de irrigação (Sinka et al., 2010). Esta espécie é encontrada numa faixa litorânea longa e, de certa forma estreita, próximo ao paralelo 24° e 30' S (Peruíbe, São Paulo) até a Costa Rica, no lado Atlântico, e desde esse ponto até o Golfo de Guaiaquil, no Equador, que é o seu limite sul na costa pacífica. Ocorre também nas Antilhas Menores, em Trinidad e Tobago (Consoli and Oliveira, 1994). *An. aquasalis* também tem sido considerado um importante vetor de malária nas áreas onde se encontra distribuído (Berti et al., 1993; da Silva et al., 2006; Faran, 1980).

Os hábitos do *An. aquasalis* variam de acordo com sua localização geográfica e ele é ora encarado como antropofílico, ora como zoofílico ou eclético. No Sudeste do Brasil, cujo clima é semitropical, tem sido observado ora atacando o homem ora os animais domésticos ao ar livre. Em um estudo realizado em Guapimirim, no estado do Rio de Janeiro, para investigação das fontes de alimentação do *An. aquasalis*, constatou-se que o mesmo é preferencialmente zoofílico, nessa região do país, com preferência pelo sangue de bovinos e

equinos (Flores-Mendoza et al., 1996). Já no nordeste, mais especificamente no estado do Maranhão, onde o clima é semiárido, essa espécie assume o papel de vetor principal da malária, devido sua endofilia e antropofilia e alta densidade em algumas áreas litorânea desta região (Xavier and Rebêlo, 1999) e em Belém do Pará, na Amazônia brasileira, onde o clima é equatorial, o mosquito é preferentemente zoófilo (Galvão et al., 1942). Na Guiana e no oeste panamenho, verificou-se que é um mosquito muito zoófilo, não sendo encarado como de importância epidemiológica (Flores-Mendoza et al., 1996). De uma maneira geral são exofílicos, com atividade crepuscular e noturna (Rosa-Freitas et al., 1998). No Brasil, o *Anopheles aquasalis* já foi encontrado naturalmente infectado por *Plasmodium* sp. em algumas regiões como Belém, estado do Pará (da Silva et al., 2006) e no estado do Maranhão (Xavier and Rebêlo, 1999), além de toda a região por onde encontra-se distribuído, principalmente durante a década de 40, quando a malária apresentava-se disseminada, sendo registrados mais de 6 milhões de casos espalhados pelo país (Bastos, 1996) (Figura 5).

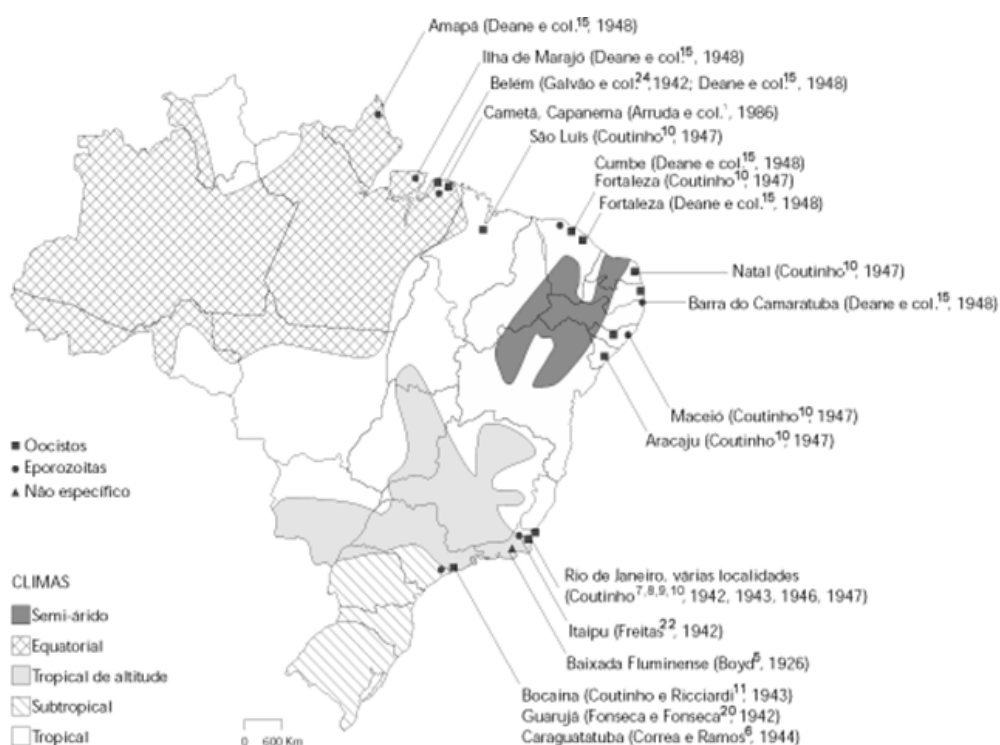


Figura 5. Dados sobre o encontro de infecção natural de *Anopheles aquasalis* por *Plasmodium* spp. no Brasil. Fonte: Bastos, 1996.

1.7 Colonização laboratorial de *Anopheles aquasalis*

Os primeiros estudos sobre a bionomia do *An. aquasalis* datam do início da década de 50 (SENIOR WHITE, 1951a, b). Em 1957, Omardeen e colaboradores realizaram um estudo sobre os hábitos alimentares dessa espécie na região costeira de Trinidad, na Venezuela (OMARDEEN et al., 1957). Desde então a maioria dos trabalhos relacionados à essa espécie foram realizados através de captura no campo.

No Brasil, o *An. aquasalis* foi colonizado pela primeira em 1995, pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz/RJ (LIMA, 2009). Os espécimes foram coletados na parede de um curral em Guaraí, município de Guapimirim, Rio de Janeiro, e desde o início foram mantidas por meio de cópula livre, não sendo necessária a realização do procedimento de cópula induzida. O protocolo de manutenção foi realizado com adaptações ao de Horosko et al. (1997). Ainda hoje a colônia ainda é mantida em sistema fechado através de cópula livre, e servem como base para a realização de diversos estudos (LIMA, 2009).

Já em 2006, espécimes de *Anopheles aquasalis* foram capturados na cidade de Belém e mantidos no insetário do Instituto Evandro Chagas (Da Silva et al., 2006). Para a criação das larvas, os autores utilizaram água de poço artesiano com uma salinidade de 0,04g/L, trocada somente quando havia quantidades consideráveis de detritos na superfície ou no fundo do recipiente. Ração para peixe triturada Tetramin® era fornecida às larvas duas a três vezes ao dia. Em condições padronizadas no estudo, ocorreu a cópula natural desta espécie em cativeiro, assim como oviposição natural e, consequente obtenção de nove gerações deste anofelino. A taxa de mortalidade das larvas foi inferior a 1% e o tempo médio decorrido desde a eclosão dos ovos até a fase de pupa foi de 6,4 dias. Os autores atribuíram a baixa mortalidade a esse conjunto de fatores utilizados para a manutenção da espécie, distintos das técnicas utilizadas para o estabelecimento de colônias de *A. deaneorum* (Klein et al., 1990), e *A. albitarsis* (Horosko et al., 1997).

1.8 - Bacilos entomopatogênicos

As bactérias potencialmente ativas contra insetos são aquelas que apresentam capacidade de se multiplicar no organismo dos mesmos, levando à septicemia, ou então aquelas capazes de produzir entomotoxinas ativas em qualquer estágio de vida do seu

hospedeiro. Segundo critérios de Falcon (1971), as bactérias entomopatogênicas são agrupadas em duas categorias: esporulantes e não esporulantes. As bactérias esporulantes são tidas como de maior interesse comercial no controle biológico de insetos por persistirem mais tempo no ambiente e pela facilidade de produção em escala industrial. As esporulantes incluem as espécies aeróbias estritas e a maioria das facultativas (produtoras ou não de cristais proteicos), as quais se agrupam na família Bacillaceae (Costa et al., 2009/2010).

As bactérias do gênero *Bacillus* spp. possuem ação larvicida pois, durante a esporulação, essas bactérias são capazes de produzir inclusões cristalinas que possuem protoxinas de natureza protéica com atividade larvicida para algumas espécies de dípteros, além de outras ordens de insetos. Seus esporos são aplicados em ambientes aquáticos que servem como criadouros das larvas. Após a ingestão dos cristais pelas larvas, as protoxinas são liberadas no lúmen intestinal e processadas em toxinas que são responsáveis pela ação letal (Figura 6). Essa é uma estratégia que têm sido usada para o controle de vetores devido às facilidades para a produção em larga escala, armazenamento, transporte e aplicação (Lacey, 2007) além da especificidade da ação dessas toxinas para um grupo limitado de organismos alvo. Nesse contexto, as duas espécies mais estudadas e utilizadas são o *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (de Barjac, 1978) e o *B. sphaericus* (Kellen et al., 1965). Estas são bactérias Gram positivas, cosmopolitas e ocorrem tanto em solos quanto em ambientes aquáticos (Vilarinhos, 2003).

Os esporos produzidos por algumas espécies de bacilos são altamente hidrofóbicos e hábeis a aderir firmemente a vários substratos. Assim, a colonização para formação do biofilme pode ocorrer quando as condições ambientais estiverem favoráveis à formação de esporos bacterianos. A carência de nutrientes, assim como temperatura e pH estão diretamente envolvidos no processo de formação de esporos e biofilme (Wijman et al., 2007) (Janneke et al., 2007). Por isso, bacilos entomopatogênicos apresentam uma enorme capacidade de persistência no ambiente, essa capacidade também é comum em cadáveres de larvas, o que contribui enormemente para sua persistência em ambientes infestados com formas larvais de culicídeos suscetíveis (Andrade, 1992; Vilarinhos and Monnerat, 2004). Assim, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*, são utilizadas no controle biológico das larvas de mosquitos, tendo se destacado entre as diversas estratégias que compõem os programas de manejo integrado desde a década de 70. A partir de 1977, houve notável avanço com a descoberta e tipificação do *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*, de alta atividade larvicida para simulídeos e culicídeos de vários gêneros (Cavados et al., 2001). Também foi o

caso do *Bacillus sphaericus*, que a partir de 1979, começou a ser utilizado para o controle de culicídeos dos gêneros *Anopheles* (Tinelli et al., 1980) e *Culex* (Davidson, 1979).

1.9 *Bacillus sphaericus*

Bacillus sphaericus Neide (1904) é uma bactéria em forma de bastonete, aeróbica, Gram-positiva, formadora de esporos esféricos, pertencente à família Bacillaceae, comumente isolada do solo (Brownbridge and Margalit, 1987; Manonmani et al., 1990; Schenkel et al., 1992), podendo também ser encontrada na água e outros substratos naturais (Mulla et al., 1997). Embora isolada e identificada pela primeira vez em 1904 (Neide, 1904), apenas em 1965 foi descoberta a atividade tóxica de *B. sphaericus* contra larvas de culicídeos (Kellen et al., 1965).

O principal fator inseticida do *B. sphaericus* é a toxina binária (Bin) compostas por proteínas de 42-kDa e 51-kDa (Arapinis et al., 1988; Baumann et al., 1988; Baumann et al., 1987; Berry and Hindley, 1987; Berry et al., 1989; Hindley and Berry, 1988), denominadas de Bin A e Bin B, respectivamente (Charles et al., 1997). Essas duas proteínas são sintetizadas em quantidades aproximadamente equimolar, montados em estruturas cristalinas, e visíveis em estágios de fase III de esporulação (Baumann et al., 1985; Kalfon et al., 1984; Yousten and Davidson, 1982). Bin B não é tóxica, mas está envolvida na ligação a um receptor específico em *Culex pipiens*, de 60 kDa - α Glicosidase, sobre as microvilosidades no intestino médio das larvas do mosquito (Silva-Filha et al., 1999). Bin A liga de forma eficiente apenas na presença de Bin B e é responsável pela atividade larvicida. Larvas de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823, *C. pipiens* Linnaeus, 1758 e *Anopheles gambiae* são suscetíveis à toxina graças à disponibilidade de receptores no epitélio intestinal, enquanto que *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* Linnaeus, 1762, é considerada uma espécie refratária, devido à ausência de interação da toxina Bin com receptores (Nielsen-Leroux and Charles, 1992).

Já as toxinas mosquitocidas (Mtx) são descritas três tipos: Mtx1, Mtx2 e Mtx3, com peso molecular de 97, 31,8 e 35,8 kDa, respectivamente e têm sido encontradas associadas com a membrana celular de *B. sphaericus*. Os genes que codificam essas proteínas foram inicialmente clonados da estirpe SSII-1 de *Bacillus sphaericus* (Liu et al., 1996; Thanabalu et al., 1991; Thanabalu and Porter, 1995), que tem uma atividade mosquitocida moderada. Ao contrário dos genes da toxina de cristal, os genes mtx são expressos durante o crescimento vegetativo. A toxina Mtx1 pode ser futuramente processada pelas proteases intestinas gerando

dois fragmentos de 27 e 70 kDa, correspondendo às regiões N- e C- terminal, respectivamente (Thanabalu et al., 1992). Os genes que codificam as Mtx são comuns entre várias estirpes de *B. sphaericus* (Charles et al., 1996; Liu et al., 1993) de baixa, média e alta toxicidade (Charles et al., 1996).

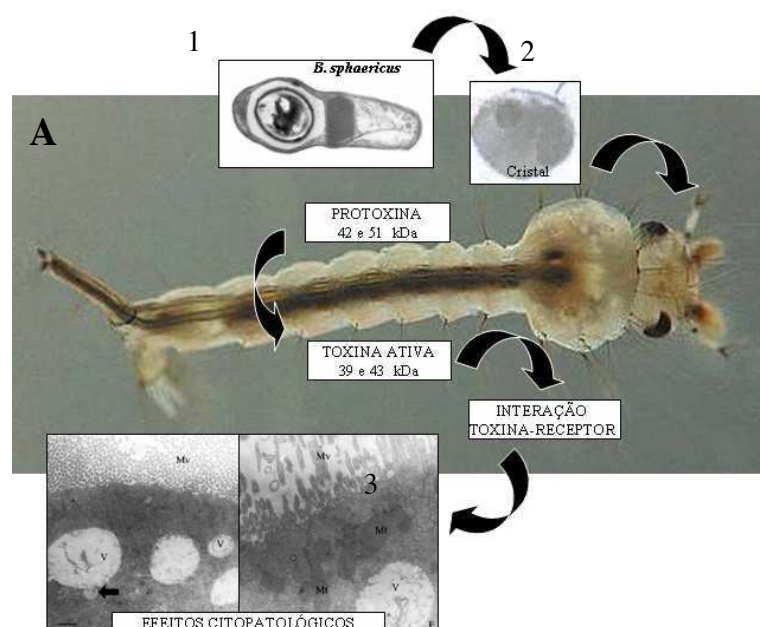


Figura 6. Ilustração do modo de ação da toxina Bin do *Bacillus sphaericus* em larvas de mosquito. 1: esporângio de *B. sphaericus*; 2: cristal proteico; 3: micrografia evidenciando o efeito citopatológico da toxina no epitélio intestinal da larva mosquito. Fonte: (Melo and POMPÍLIO, 2010)

1.10 Tipagem molecular e sorológica de *Bacillus* sp.

Na década de 80, a relação entre as estirpes de *B. sphaericus* foram analisadas por homologia do DNA o qual cinco grupos foram inicialmente identificados, mas o grupo II foi subdividido em IIA (acima de 79% de identidade, contendo todas as estirpes toxicas) e IIB (Krych and Johnson, 1980). Outros tipos de análises das estirpes de *B. sphaericus* também podem ser realizadas, incluindo dois sistemas: tipagem bacteriófaga (Myers and Yousten, 1980; Yousten, 1984) e sorotipagem usando antígeno flagelar como para *Bacillus thuringiensis* (Yousten et al., 1980), na qual as amostras relacionadas bioquimicamente são divididas em subgrupos ou tipos, por critério sorológico, de acordo com a presença dos antígenos: somático (O), flagelar (H) e de envoltório ou cápsula (K). Desse modo, os sorotipos são divisões baseadas no relacionamento antigênico, enquanto os biótipos são amostras da mesma espécie que diferem em características bioquímicas.

Após o advento da biologia molecular, várias técnicas mais refinadas surgiram para aprimorar a identificação de genes específicos, inclusive daqueles relacionados à toxicidade das estirpes (Berry and Hindley, 1987; Hindley and Berry, 1987, 1988). Existem atualmente várias sequências gênicas depositadas e disponíveis em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> que podem permitir análises moleculares mais detalhadas, incluindo o desenho de iniciadores específicos para identificação de genes relacionados à toxicidade das estirpes, como já vem sendo realizado e aprimorado (Jagtap et al., 2009; Yuan et al., 2001; Yuan et al., 2002).

2 Justificativa

O estabelecimento de colônias de vetores neotropicais da malária é essencial como ferramenta para pesquisas de controle desses vetores, bem como desenvolver estudos relacionados à sua biologia e a interação parasito-vetor. No entanto, atualmente existem poucas referências sobre a manutenção de colônias estáveis de anofelinos neotropicais em insetários brasileiros. Os mosquitos *Anopheles aquasalis* mantidos no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz (CPqRR – Fiocruz/MG) são originários de uma colônia estabelecida em 1995, no Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ, e sua criação autônoma têm sido mantida desde de 2004. No entanto, desde a sua implantação observamos uma oscilação significativa na produção de mosquitos, muitas vezes relacionada à mortalidade excessiva de larvas.

Esse estudo teve como objetivo geral a investigação das causas relacionadas ao aumento de mortalidade das larvas de *An. aquasalis*, no insetário do Laboratório de Malária (CPqRR), através da análise microbiológica da água utilizada na criação das larvas, com ênfase em bacilos entomopatogênicos. Espera-se que os resultados obtidos aqui contribuam no estabelecimento de novas estratégias de manutenção da colônia dessa espécie de anofelino em laboratórios brasileiros, podendo auxiliar os diversos grupos de pesquisa em malária que pretendem implantar e/ou manter colônia de anofelinos vetores fora da área endêmica.

3 Objetivo geral

Identificar contaminantes da colônia de *Anopheles aquasalis*, com ênfase em bacilos entomopatogênicos, no intuito de estabelecer medidas de controle de contaminação em colônias mantidas em insetários.

3.1 Objetivos específicos

1. Confirmar a presença de bacilos entomopatogênicos na colônia de *An. aquasalis* através da identificação morfológica dos microrganismos isolados;
2. Identificar a(s) fonte (s) de contaminação da colônia;
3. Investigar a ocorrência de contaminação por bacilos entomopatogênicos em outros insetários;
4. Identificação molecular dos genes relacionados à toxicidade das estirpes isoladas;
5. Analisar a toxicidade das estirpes isoladas para as larvas de *Anopheles aquasalis* através de bioensaio qualitativo.

4 Metodologia:

4.1 Criação de *Anopheles aquasalis* no insetário do Laboratório de Malária do CPqRR

Para manutenção da colônia de *Anopheles aquasalis*, os mosquitos adultos (machos e fêmeas) são mantidos em gaiolas (Figura 7) em condições de temperatura e umidade controladas ($27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$; $80 \pm 5\%$) e fotoperíodo de 12h, e alimentados *ad libitum* com solução açucarada a 10%. Para a postura de ovos, o repasto sanguíneo das fêmeas é realizado semanalmente, utilizando para isto camundongos anestesiados (Licença CEUA: LW 49/2010. Anexo I). A postura é realizada em um recipiente com água, forrado internamente com papel de filtro e introduzidos no interior das gaiolas três dias após o repasto das fêmeas. Os copos contendo os ovos podem ser retirados das gaiolas, dois dias após o início da postura, e devem ser então transferidos para recipientes próprios com água até a eclosão e nascimento das larvas. As larvas são mantidas em cubas retangulares (40 cm comprimento x 12 cm largura x 4 cm altura), contendo uma mistura de água do mar e água declorada, na proporção 1:10 (v/v) e são divididas de forma que em cada cuba ficam cerca de 100 larvas. Essas são alimentadas diariamente com ração para peixe triturada (Tetramin Pro[®], pulverizada em peneira para granulometria de 150 μm para L1 e 300 μm para as formas maiores). As larvas se desenvolvem quatro estádios, denominados L1, L2, L3 e L4 que levam cerca de 10 a 12 dias para serem concluídos, após este período as larvas transformam-se em pupas. Ao atingirem esse estágio, as pupas, são transferidas para copos plásticos (30 mL) e colocadas no interior de gaiolas até a emergência dos adultos. O número total de pupas coletadas diretamente é registrado em formulário próprio, reiniciando assim o ciclo de vida.



Figura 7. Gaiola de criação dos *Anopheles aquasalis* - dimensões 166 mm (diâmetro interno) x 175 mm (altura interna)

4.2 Monitoramento da produção de *Anopheles aquasalis*

O monitoramento da produção de *Anopheles aquasalis* foi feito através da contagem diária das pupas coletadas e posterior registro em formulário próprio (anexo ao POP de manutenção de colônias de *Anopheles aquasalis* – LAMAL-11 – Anexo II). Ao final de cada mês, os dados foram lançados em planilhas e posteriormente analisados graficamente. O registro das datas de realização de repasto sanguíneo para oviposição também foi realizado.

4.3 Coleta das amostras de água para análise da presença de *Bacillus* sp.

4.3.1 Coleta de amostras no insetário do Laboratório de Malária do CPqRR

As amostras de água de diversas fontes e locais suspeitos de contaminação (Figura 8) foram coletadas nos períodos em que houve aumento da mortalidade das larvas L3 e L4, com o auxílio de uma pipeta Pasteur de plástico, depositadas em tubos de 15 mL estéreis previamente identificados e datados.

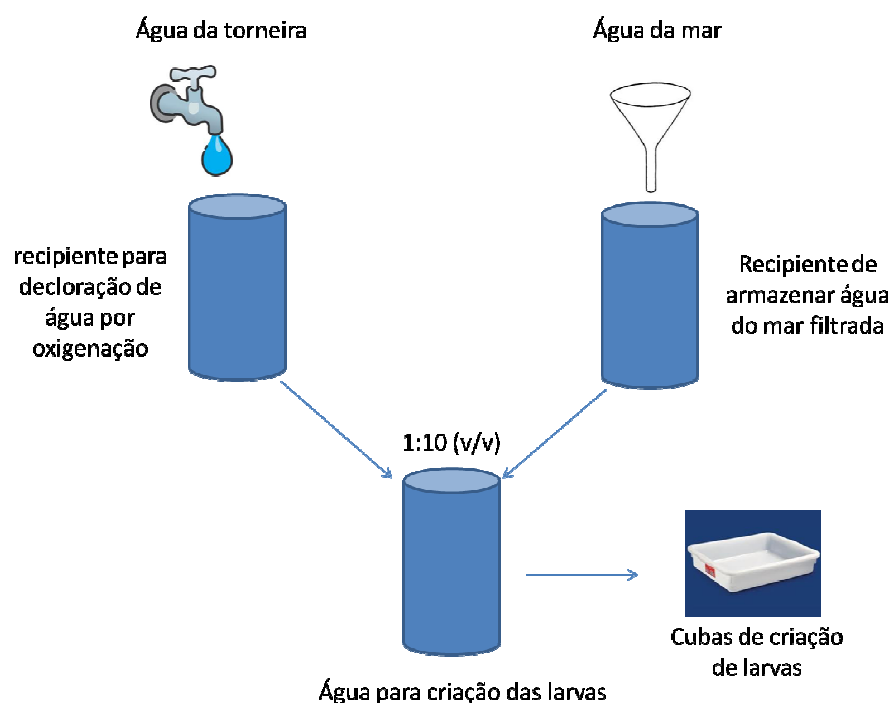


Figura 8. Esquema ilustrativo dos recipientes de armazenamento de água utilizadas na manutenção da colônia de *An. aquasalis*

4.3.2 Coleta de amostras de outros insetários

Com a finalidade de investigar a ocorrência de contaminação por bacilos entomopatogênicos em colônias de *An. aquasalis* estabelecidas em outros locais, foi feita a coleta e avaliação de amostras provenientes de outros laboratórios de pesquisa e produção. Assim, as amostras, gentilmente cedidas, foram provenientes de três laboratórios distintos:

- Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores, Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG. Gentilmente cedidas pela Dra. Luciane Gomes Batista Pereira.
- Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro/RJ, gentilmente cedidas pelo Dr. José Bento Pereira Lima e Dra. Denise Valle;
- Divisão de Saúde Ambiental da BIOAGRI Laboratórios S.A., São Paulo/SP, gentilmente cedidas pela Dra. Márcia de Camargo Ranzani.

4.4 Caracterização morfológica dos microrganismos isolados

O método utilizado para o isolamento das colônias foi o descrito pela Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 1985), e consiste basicamente em submeter as amostras ao choque térmico (80 °C por 12 minutos / gelo por 5 minutos) e em seguida ao plaqueamento em meio sólido. Após 24 horas à temperatura de 30°C, as colônias já podem ser visualizadas. Nesse estudo, para o plaqueamento das amostras foi utilizado meio Agar Nutriente (Yousten, 1984), sem antibiótico. As amostras de água (4 mL) de diversas fontes e locais suspeitos de contaminação foram coletadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril e armazenadas em tubo Falcon de 15 mL, estéril. Após a coleta, as amostras foram submetidas ao choque térmico e um volume de 50 µL de cada amostra foi plaqueado individualmente sobre o meio Agar nutriente (Difco®) com o auxílio de uma haste de vidro (alça de Drigalski), próximo a um bico de Bunsen, para evitar contaminação cruzada. Após o plaqueamento as placas foram mantidas em uma estufa à temperatura de 30 °C e analisadas após 24h e 48h. Após o período de incubação, as colônias foram quantificadas e caracterizadas quanto às suas características macroscópicas, tais como: formato da colônia, coloração e aspecto. A caracterização morfológica das estirpes isoladas efetuou-se ao microscópio de contraste de fase, sob a objetiva de 100x (ampliação total de 1000 vezes), através de suspensão a fresco realizada com a deposição de uma pequena amostra da colônia,

em uma gota de solução salina (0,85%), entre lâmina e lamínula. A caracterização microscópica foi feita através da observação de características fenotípicas como: arranjo estrutural, morfologia das células vegetativas, esporângio, esporos e cristais (quando presentes). Para melhor caracterização das amostras, as mesmas foram coradas pelo método de Gram (Hucker, 1921).

4.5 Análise das colônias

As colônias foram analisadas quanto aos aspectos macroscópicos, tais como: coloração, tamanho, forma, borda e superfície, e também quantificadas após um período de 24h e 48h de incubação. Após a quantificação foi calculado o número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) de amostra.

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{nº de colônias na placa} \times \text{fator de diluição}}{\text{Volume plaqueado}}$$

4.6 Isolamento de *Bacillus* sp. da ração utilizada na alimentação das larvas

No intuito de se identificar novos focos de contaminação por *Bacillus* sp., investigou-se a presença desse na ração utilizada para alimentação das larvas. A ração utilizada é a ração comercial Tetramin® (ração para peixes). No preparo, a ração é triturada com o auxílio de um liquidificador e posteriormente peneirada em peneira granulométrica (abertura 80 μm).

Para investigar o isolamento de bacilos da ração, misturou-se 1g da ração à 75 mL de água estéril. Em seguida a solução foi homogeneizada e incubada, sob agitação à 175 rpm e a 30 °C por 6h. Após esse período, foi inoculado 1 mL da suspensão em caldo nutriente e incubado por 48h. O produto final foi então submetido ao choque térmico (80 °C/12min e gelo/5min) e realizadas diluições seriadas a partir de 10⁻⁵ seguidas do plaqueamento em meio ágar nutriente.

4.7 Referências das estirpes de *Bacillus sphaericus* utilizadas como controle nos ensaios moleculares e biológicos

As estirpes de *Bacillus sphaericus* utilizadas a título de comparação nesse estudo foram identificadas e gentilmente cedidas pela Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus* e Gêneros Correlatos (CCGC), do Laboratório de Fisiologia Bacteriana (LFB) do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz/RJ, tratam-se das estirpes: LFB-736 (2362): estirpe tóxica, originalmente

isolada de *Simulium damnosum* na Nigéria, e indicada pela OMS para utilização em controle de *Culex* sp. e *Anopheles* sp., LFB-847 (SSII-1): estirpe atóxica e LFB-711 (NI-404). Todas as estirpes foram conservadas a 4-8 °C como culturas cultivadas em meio NYSM (Myers & Yousten 1978).

4.8 Detecção de genes codificadores de toxinas entomopatogênicas

O diagnóstico das toxinas entomocidas em *B. sphaericus* foi realizado por meio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para detecção dos genes codificadores das toxinas binárias (BinA e BinB) e Mtx (1, 2 e 3). O protocolo de preparação das amostras para a amplificação foi realizado como descrito por Jagtap *et al.* (2009), com modificações (Tabela 1).

Tabela 1. Sequencias dos oligonucleotídeos utilizados na identificação dos genes das toxinas por PCR

Gene	Iniciadores	Sequencia 5' - 3'
<i>bin b</i>	F	CCCCAAACATCCTTACTTGAGA
	R	GCGCACTTCCTTTAACTGCT
<i>mtx 1</i>	F	ATCCCTCTTTTGCTTCTCCA
	R	AGCACTATGAGGTGTCCAAGG
<i>bin a</i>	F	CCAGAAAACGAGCAATACCC
	R	GACCACATGCTTTGCCAATA
<i>mtx 2</i>	F	TGATTGCAAGCTTTTTGTTTG
	R	CAGATGCTTCCCCAGATGTTA
<i>mtx 3</i>	F	TAGCTTTCCAGATGCAGCAA
	R	CGAAGTCTCATTTGCCTGACT

Fonte: Jagtap *et al.* (2009).

Brevemente, as amostras de bactérias foram inoculadas em placas de ágar nutriente (30% de caldo nutriente – Difco® e 15% de ágar-ágar), e incubadas por 24h a 30°C. Como no protocolo utilizado não é necessária a extração do DNA, para a padronização da quantidade de amostra, realizou-se inicialmente a PCR comparando amostras obtidas: i) repique direto da placa de ágar-nutriente (cultivo 24h/30 °C); ii) 1 µL de cultura líquida em meio caldo nutriente; iii) 1 µL de produto da diluição de uma colônia em 100 µL de água livre de nuclease; iv) 2 µL de produto da diluição de uma colônia em 100 µL de água livre de nuclease. O protocolo para obtenção da amostra que demonstrou melhor amplificação foi utilizado nos experimentos posteriores. A reação de PCR foi realizada utilizando o kit comercial Master Mix – Promega®, segundo instruções do fabricante: para um volume final

de 25 μ L foram adicionados 12,5 μ L de Master Mix; 1 μ L de cada par de oligonucleotídeos [10 μ M] (Tabela 1); 9,5 μ L de água livre de nuclease. As condições para amplificação foram as mesmas descritas por Jagtap et al. (2009): desnaturação inicial, 95°C por 4 minutos (min.), 35 ciclos de 95°C por 45 segundos (seg.), 52°C por 30 seg. e 72 °C por 80 seg., seguidos por uma incubação final de 72°C por 7 min. Após a amplificação, 10 μ L de cada produto de PCR foram aplicados em gel de agarose (2%), posteriormente corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL). As bandas foram visualizadas utilizando um fotodocumentador (BioDoc Systems™) com luz UV. A estirpe *B. sphaericus* 2362, que possui os genes codificadores das cinco toxinas entomopatogênicas analisadas, foi utilizada como controle positivo assim como a estirpe e LFB-7711.

Para determinar o perfil de toxinas de cada uma das amostras, cada par de iniciadores foi testado individualmente, assim para cada amostra foram realizadas 5 reações, gerando fragmentos de diferentes tamanhos para cada gene: Bin A (100 bp), Bin B (200 bp), Mtx1 (300 bp), Mtx2 (810 bp) e Mtx3 (400 bp). Para os ensaios de multiplex, os iniciadores foram usados em associação. Como referencia para o cálculo do tamanho do fragmento gerado, utilizou-se um marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen®).

4.9 Bioensaio qualitativo para estudo da toxicidade das estirpes de *Bacillus* sp. isoladas no estudo

Para o estudo da toxicidade das estirpes isoladas, as amostras foram inoculadas em meio NYSM-Ágar (Yousten, 1984) à 30 °C por 48h. Após esse período um repique da colônia foi ressuspensionado em solução 0,85% de cloreto de sódio. A densidade ótica em 600nm foi então medida e ajustada para 0,1. Após a leitura, 1 mL da suspensão foi adicionada à copos com 50 mL de água contendo 15 larvas de 3º ínstar de *Anopheles aquasalis* e incubadas à 26 °C por 48h (Oliveira et al., 1998). Como referência de toxicidade foi usada a estirpe 2362 (LFB-736). Todas as amostras foram testadas em duplicata e foram realizadas três repetições. Como controle negativo, em duas amostras de larvas foi adicionado apenas solução salina (sem suspensão de bactérias). Uma estirpe de menor toxicidade (sem a presença dos genes para toxinas Bin e Mtx) foi também utilizada para fins de comparação, além de duas estirpes de *Bacillus cereus* isoladas da ração Tetramin®. Para avaliar a toxicidade das estirpes em diferentes estádios de desenvolvimento dos mosquitos, o mesmo protocolo foi realizado com larvas de 4º estágio. A toxicidade foi determinada através do cálculo de mortalidade de larvas (porcentagem de larvas mortas), por amostra resultado da média entre os três experimentos.

As amostras que causaram mortalidade larval menor do que 20% foram consideradas de baixa toxicidade; entre 21% e 50% foram consideradas de média toxicidade; mortalidade maior que 50% foram consideradas de alta toxicidade e a mortalidade (Oliveira et al., 1998).

4.10 Teste de crescimento bacteriano na presença de compostos orgânicos

Com a finalidade de realizar o controle químico da contaminação através da higienização das bacias de criação de larvas, foi realizado o teste de crescimento bacteriano para testar quatro sanitizantes químicos comerciais (álcool 70%, hipoclorito 1%, ácido peracético 1% e ácido acético 10%). Para isso as amostras isoladas foram crescidas em meio NYSM-ágar por 48h à 32 °C. Após o período de incubação, uma amostra da colônia da superfície do meio de cultura foi ressuspensa em 0,85% de NaCl e a densidade óptica ajustada para 0,1 à 600 nm, o que resulta numa suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC/mL de bactérias. Para a inoculação da solução teste, foi realizada a remoção do meio de cultura sólido com o auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais foi possível a aplicação das substâncias a serem analisadas. Para testar a atividade antimicrobiana dos compostos, a suspensão de bactérias foi plaqueada sobre a superfície do meio Agar Mueller-Hinton, com auxílio de um swab embebido na suspensão de bactérias. Após plaqueamento, os poços foram preenchidos com 200ul da solução teste, sendo as placas incubadas à 30°C por 16h a 24h. Após o período de incubação, suficiente para o crescimento do tapete bacteriano e formação dos halos, o líquido contido nos poços foi aspirado com o auxílio de uma pipeta, e os halos medidos com o auxílio de um paquímetro. A medição foi feita com a placa invertida, a poucas polegadas acima de um fundo não refletor, iluminando-a com luz refletida. A padronização do teste foi feita inicialmente utilizando-se a estirpe BS 2362 e posteriormente testada com as amostras isoladas no estudo.

5 Resultados:

5.1 Monitoramento da colônia de *Anopheles aquasalis*

A colônia de *Anopheles aquasalis* foi iniciada no laboratório de malária do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) no ano de 2004, a partir de larvas gentilmente cedidas pelos pesquisadores José Bento P. Lima e Denise Valle, Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Departamento de Entomologia do Instituto de Biologia do Exército/FIOCRUZ (Benfica-RJ). No entanto, desde a sua implantação, em 2004, a quantificação de estágios pupais não era realizada na rotina, o que inviabilizava avaliar a produção de insetos adultos. Visando avaliar a estabilidade da produção de mosquitos *An. aquasalis* no laboratório, um dos objetivos iniciais deste projeto foi monitorar a colônia, o que passou a ser realizado pela quantificação diária dos estágios pupais (início 2008).

A figura 9 ilustra a produção de diária de pupas de *An. aquasalis*, no período correspondendo de janeiro de 2009 a dezembro de 2011. Como pode ser observado, a produção dos estágios pupais flutuou, ao longo dos meses, com períodos de baixa produção alternados por períodos de alta produção. De interesse, a flutuação na produção de pupas não esteve relacionada a uma época do ano específica. Apesar disto, o ano de 2010 foi o que alcançou melhores resultados, com cerca de 12.000 pupas apenas no mês de maio, e uma média anual de 5527 pupas. Já no ano de 2011, coincidindo com uma mudança física do insetário, observamos uma queda gradativa na produção.

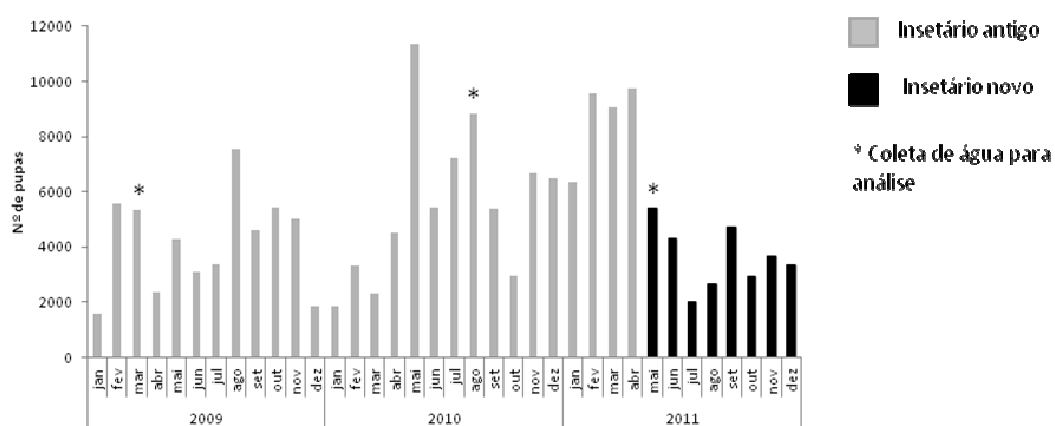


Figura 9. Quantificação mensal de pupas de *Anopheles aquasalis* coletadas no insetário do Laboratório de Malária do CPqRR, período 2009 - 2011

5.2 Características morfológicas das larvas mortas

Durante os períodos de queda na produção, observou-se que a baixa se dava devido, principalmente, à mortalidade excessiva de larvas de L3 e L4. Essas larvas apresentavam como características escurecimento na região dorsal, acompanhando o tubo intestinal e um leve encurvamento (Figuras 10B e 10C). As larvas mortas também apresentavam como característica um alongamento da região entre a cabeça e o tórax, assemelhando-se a um “pescoço” (Figura 10C). As larvas vivas que se encontravam juntas das mortas apresentavam alterações nos movimentos, indicando problemas relacionados à motilidade, mas sem alterações morfológicas visíveis. O fenômeno de canibalismo também foi observado com frequência, com dilacerações de algumas larvas (dados não mostrados).

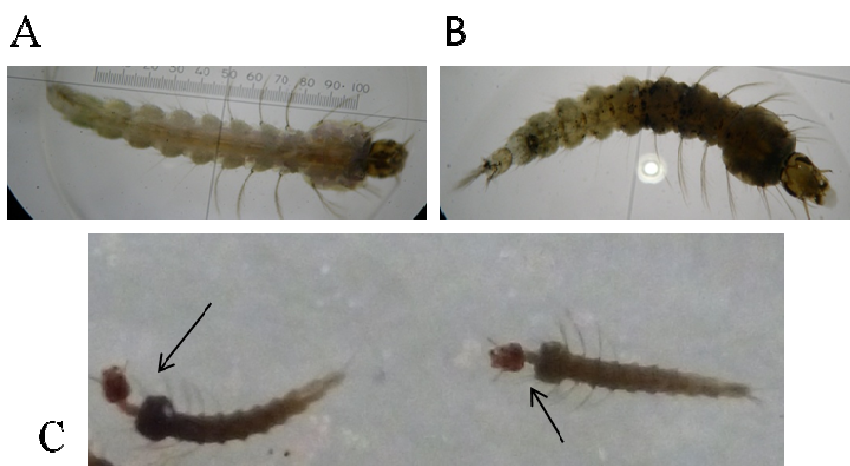


Figura 10. Foto da larva de 4º estágio de *Anopheles aquasalis* com aspecto saudável (A) e com morfologia alterada pela ação de toxinas de *B. sphaericus* (B e C). As setas indicam alongamento da região entre a cabeça e o tórax.

5.3 Análise microbiológica das amostras de água utilizadas na criação dos mosquitos *An. aquasalis*

Em função da flutuação na produção de pupas, coincidindo com períodos de queda na produção e mortalidade de estágios larvais (L3-L4), foram feitas coleta de amostra de água utilizada na criação (Figura 8), visando com isto análises microbiológicas. Como a análise morfológica inicial das larvas sugeria contaminação por bacilos entomopatogênicos, todas as análises futuras foram direcionadas à caracterização destes bacilos.

5.3.1 Análise macroscópica

Em todas as amostras de águas analisadas para bactérias entomopatogênicas, o aspecto das colônias obtidas no ágar foi semelhante. Mais especificamente, as mesmas apresentaram cor bege, consistência pastosa, medindo de 1 mm a 5 mm de diâmetro, com borda irregular e aparência brilhante (Figura 11).



Figura 11. Foto ilustrativa da placa de cultura em meio ágar nutriente evidenciando as colônias sugestivas de bacilos entomopatogênicos (placa de 92 mm x 16 mm)

5.3.2 Análise microscópica

A identificação morfológica das estirpes isoladas nesse estudo foi realizada no Laboratório de Fisiologia Bacteriana do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz – RJ. As amostras puderam ser visualizadas através de preparação à fresco, pegando uma pequena quantidade da colônia (24h de cultivo) e espalhando sobre a lâmina, em uma gota de solução salina estéril, sobreposta por lamínula. Ao microscópio óptico de campo escuro (objetiva 100x), foi possível observar estruturas celulares em forma de bastonete, extremidades arredondadas, móveis, alinhadas em pequenas cadeias. Também foi possível observar a presença de estruturas celulares em forma de “raquete” (Figura 12), formato característico do esporângio de *B. sphaericus*, que adquire esse formato devido à deformação causada pela formação do corpo paraesporal, em uma das extremidades da célula bacteriana. Já no período de 48h de cultivo, observaram-se estruturas arredondadas semelhantes aos esporos (dados não mostrados). Dessa forma, foi possível a identificação morfológica presuntiva de *Bacillus sphaericus*.

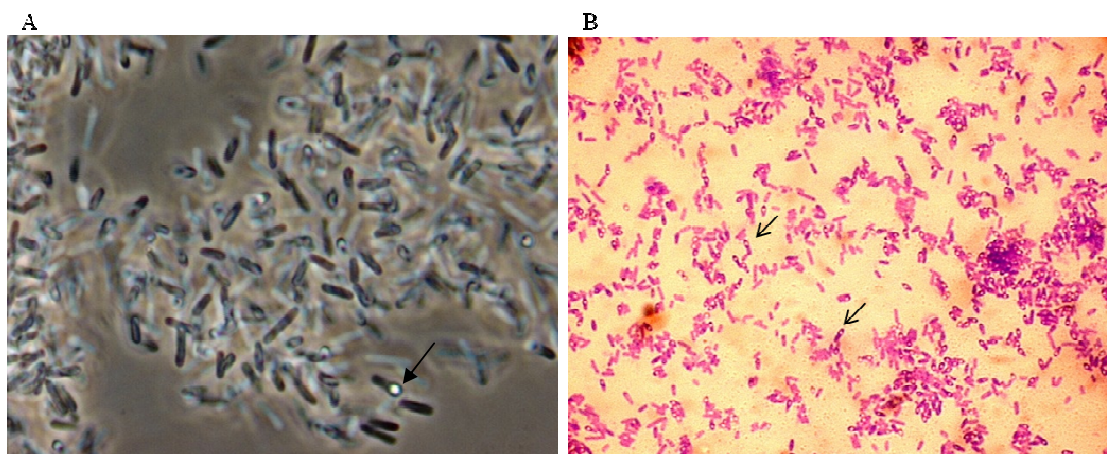


Figura 12. Foto ilustrativa de uma lâmina a fresco (A) e uma lâmina corada pelo método de Gram (B) (aumento de 1000x). As setas indicam os esporângios (24h de cultura).

5.4 Análise da presença de *Bacillus* sp. nas amostras coletadas

5.4.1 Amostras coletadas no insetário do Laboratório de Malária do CPqRR

Após o plaqueamento das amostras de água em placas de ágar nutriente, foi possível identificar macroscopicamente as colônias com características descritas no item 5.3.1. Os resultados mostraram que a maior concentração de bactérias foi encontrada nas amostras provenientes das cubas de criação (Tabela 2). No entanto, pequenas quantidades ($0,02 \times 10^3$ UFC/mL) também foram detectadas em outros recipientes de armazenamento de água utilizados na manutenção da colônia, tais como recipientes de água desclorada. Nenhuma contaminação foi encontrada em amostras provenientes diretamente de água tratada (tipo II), água corrente (torneira) ou de água do mar (estoques) (Tabela 2). De importância, a contaminação foi detectada em todo o período investigado (2009 a 2012), seja pela característica das larvas mortas ou pela identificação microscópica e/ou molecular. Em nenhuma amostra de água das cubas da desova e nos estádios L1-L2 foi detectada contaminação por *Bacillus* sp. assim como não foi verificada mortalidade de larvas (dados não mostrados).

Tabela 2. Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) das estirpes de *B. sphaericus* isoladas das amostras de água do Laboratório de Malária de 2009 à 2012

Amostras	Origem	UFC ($\times 10^3$)		
		2009*	2011	2012
1	Cuba de larvas L3-L4	16	20	20
2	Recipiente de água decolorada	0,02	0,02	0,08
3	Água da torneira insetário	0	0	0
4	Água salina estoque (filtrada)	0	0	0
5	Água barrilete	0	0,02	0
6	Cuba de larvas diluída 1:10	0,22	3,64	>20
7	Água tipo II	0	0	0

*2010, contaminação identificada apenas pelas características morfológicas das larvas mortas

5.4.2 Amostras coletadas em outros insetários

Visando avaliar se a contaminação com bacilos entomopatogênicos era um problema apenas da colônia do LAMAL, buscou-se aqui investigar possível contaminação de outras colônias de *An. aquasalis*. A tabela 3 ilustra os resultados obtidos com amostras coletadas em colônias de *An. aquasalis* de três insetários distintos. Dois dos três insetários apresentaram contaminação com bacilos, representado pelo número (≤ 2 UFC/mL), sendo a contaminação encontrada predominantemente nos estágios de L3-L4. Nas amostras de água das cubas da desova e nos estádios L1-L2 não foi detectada contaminação por *Bacillus* sp.

Tabela 3. Unidades formadoras de colônias (UFC)/mL das amostras de três insetários distintos

Origem da amostra	Insetário 1	Insetário 2	Insetário 3
	UFC ($\times 10^3$)	UFC ($\times 10^3$)	UFC ($\times 10^3$)
Desova	-	0	0 (1)
L1-L2	0 (5)	0	0 (1)
L2-L3	-	0	0,46 (1)
L3-L4	0,47 (6)	0	2 (1)
L4	-	0	0,4 (1)

5.5 Isolamento de *Bacillus* sp. da ração utilizada na alimentação das larvas

No ensaio para investigar a presença de *Bacillus* sp. na ração utilizada na alimentação das larvas, foi possível evidenciar a presença de colônias, em ágar nutriente, com aspectos distintos entre elas e diferentes das colônias de *Bacillus sphaericus* (dados não mostrados). Essas amostras foram encaminhadas para o LFB onde foram posteriormente identificadas como *Bacillus cereus*.

5.6 PCR para identificação das toxinas

5.6.1 Resultado da padronização da reação de PCR

Com o objetivo de identificar as toxinas produzidas pelas estirpes de *B. sphaericus* isoladas da colônia de *An. aquasalis*, fez-se necessário, em uma primeira etapa, padronizar a técnica de PCR. A padronização da técnica foi realizada a partir de protocolo inicialmente descrito por Jagtap (2010), utilizando a estirpe referência 2362 que expressa todos os genes das toxinas Bin e Mtx. Os oligonucleotídeos utilizados na reação foram os mesmos utilizados pelo autor e mostraram-se eficientes para amplificar todos os fragmentos testados. No entanto, a amplificação só obteve sucesso quando os iniciadores foram testados individualmente. Assim, foram realizadas cinco reações por amostra (uma para cada par de iniciadores) sendo os melhores resultados obtidos utilizando o kit comercial PCR Master Mix – Promega® (Figura 13).



Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos da reação de PCR para amplificação dos genes das toxinas de *B. sphaericus*. Canaleta 1 a 5: reação de PCR com protocolo (Jagtap, 2010); Canaletas 6 a 10: reação de PCR utilizando Kit Master Mix – Promega®. Canaletas 1 e 6: Bin A; Canaletas 2 e 7: Bin B; Canaletas 3 e 8: Mtx1; Canaletas 4 e 9: Mtx2; canaletas 5 e 10: Mtx3. PM = padrão de peso molecular 1kb plus (Invitrogen®)

5.6.2 Padronização da quantidade de amostra

O protocolo original, descrito por Jagtap (2010), utilizava como amostra de DNA, uma pequena quantidade de cultura fresca (24h de cultivo). Com a finalidade de padronizar a quantidade utilizada, foram realizadas reações utilizando repiques de colônias com 24h de cultivo (Figura 14): Canaleta 1 - repique direto da placa em meio ágar nutriente (Difco®); Canaleta 2: 1 μ L de cultura líquida em meio caldo nutriente (Difco®); Canaleta 3: 1 μ L de produto da diluição de uma colônia em 100 μ L de água livre de nuclease; Canaleta 4: 2 μ L de produto da diluição de uma colônia em 100 μ L de água livre de nuclease. Todos os iniciadores foram testados individualmente e para 3 toxinas os fragmentos foram eficientemente amplificados (BinB, Mtx1 e Mtx3) (Figura 14). Como mostrado na figura 14, a reação de PCR multiplex não funcionou com nenhuma das amostras testadas.

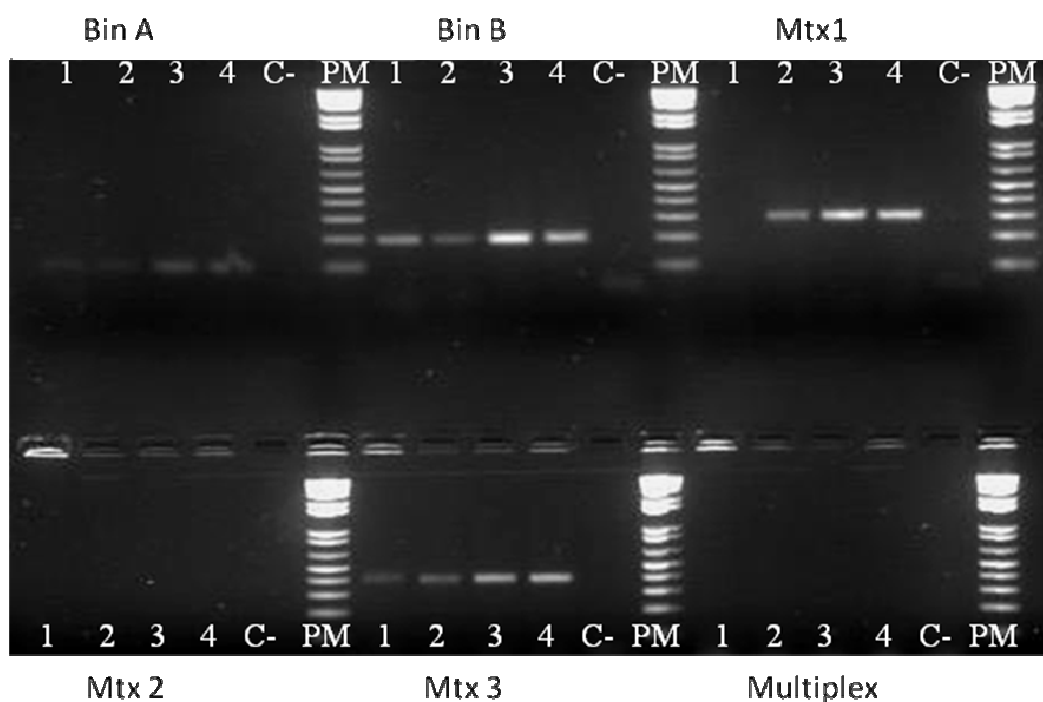


Figura 14. Eletroforese do produto da reação de PCR para padronização da quantidade de amostra utilizando a estirpe 2362. Canaleta 1: repique direto da placa; canaleta 2: 1 μ L de cultura líquida em meio caldo nutriente; canaleta 3: 1 μ L de produto da diluição de uma colônia em 100 μ L de água livre de nuclease; canaleta 4: 2 μ L de produto da diluição de uma colônia em 100 μ L de água livre de nuclease; canaleta C-: controle negativo; PM: Padrão de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen®). Os iniciadores foram testados individualmente (BinA, BinB, Mtx1, Mtx2 e Mtx3) ou em associação (Multiplex)

5.6.3 Padronização da temperatura de anelamento

Com a finalidade de determinar a melhor temperatura de anelamento dos iniciadores que não funcionaram na padronização da quantidade de amostra (BinA, Mtx2 e multiplex), foi selecionada uma faixa de temperatura que variou de 52 °C a 60 °C, utilizando as melhores condições determinadas no experimento anterior: 1 μ L de produto da diluição de uma colônia em 100 μ L de água livre de nuclease. Os fragmentos amplificaram em todas as temperaturas (Figura 15). Dessa forma, a temperatura de 52°C foi mantida.

Infelizmente, nas nossas condições, não foi possível viabilizar uma técnica de PCR multiplex. Foram testadas combinações com até três pares de primers, porém não houve amplificação de todos os fragmentos (dados não apresentados).

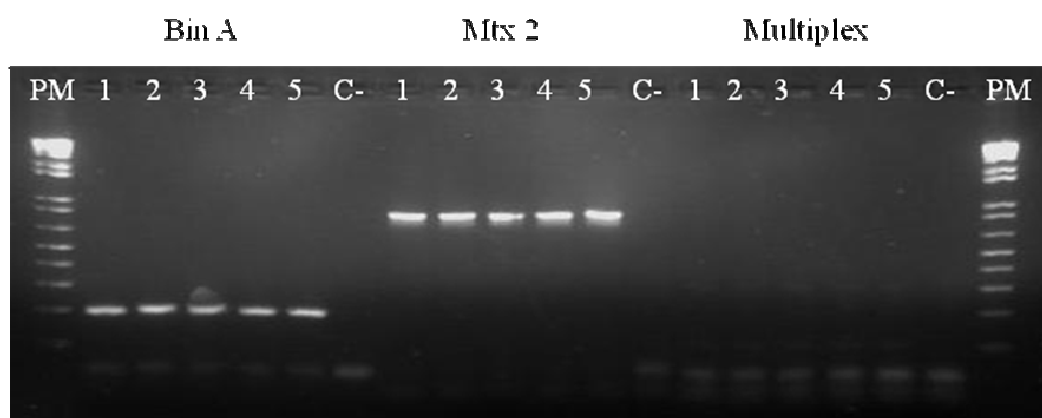


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 2% do produto da reação em diferentes temperaturas utilizando a estirpe 2362. Canaleta 1: 52°C; Canaleta 2: 54°C; canaleta 3: 56°C; canaleta 4: 58 °C; canaleta; canaleta 5: 60°C; C-: controle negativo; PM: Peso molecular 1kb plus

5.6.4 PCR para amplificar toxinas de *B. sphaericus* das amostras isoladas no Laboratório de Malária

Nas amostras coletadas no Laboratório de Malária, entre os anos de 2009 e 2012, foram isoladas 9 estirpes de *B. sphaericus* (Figura 16A). Dessas amostras, 100% apresentaram as Mtx 1, 2 e 3, e nenhuma delas apresentou toxinas de cristal (Bin). Na figura 16B é possível observar os fragmentos gerados através na reação de PCR. Estes fragmentos foram aqueles

referentes as toxinas Mtx 1, Mtx2 e Mtx3. Conforme esperado, nas estirpes referência (2362 e LFB-711), os genes das 5 entomotoxinas foram detectados (Figura 16B).

Todas as estirpes isoladas nesse estudo foram também identificadas no Laboratório de Fisiologia Bacteriana e, posteriormente, depositadas na Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus* e Gêneros Correlatos do Laboratório de Fisiologia Bacteriana (IOC-Fiocruz/RJ).

A

Canaletas	Fonte	data da coleta	UFC($\times 10^3$)/mL
			48h
1	Cuba de criação de larvas L3-L4	fevereiro-12	20
2	Cuba de criação de larvas L3-L4	fevereiro-12	20
3	Recipiente de água declorada	fevereiro-12	0,08
4	Recipiente de água declorada	fevereiro-12	0,22
5	Cuba de criação de larvas L3-L4	julho-11	0,1
6	Cuba de criação de larvas L3-L4	março-09	4
7	Cuba de criação de larvas L3-L4	junho-11	1
8	Larvas mortas	junho-11	20
9	Larvas mortas	junho-11	4,32

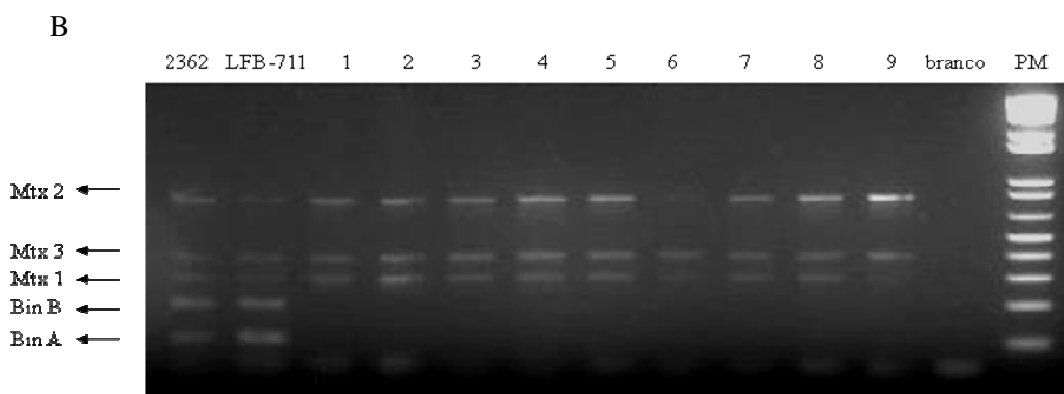


Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos PCR obtidos usando os pares de iniciadores para detecção dos genes que codificam as toxinas Bin A (100bp), Bin B (200bp), Mtx1 (300), Mtx2 (810bp) e Mtx3(400bp). Canaletas 1 a 9: amostras isoladas no insetário do Laboratório de Malária, conforme descrito em A. 2362 e LFB-711: Amostras referências.

5.6.5 PCR das amostras isoladas de outros insetários

Para determinar o perfil de toxinas das estirpes isoladas em outros insetários realizou-se a PCR nas mesmas condições padronizadas anteriormente. No insetário 1, todas as estirpes

isoladas apresentaram apenas a presença do gene Mtx3 (Figura 17), enquanto no insetário 3, todas estirpes analisadas apresentaram todos os genes Mtx (1, 2 e 3) (dados não ilustrados).

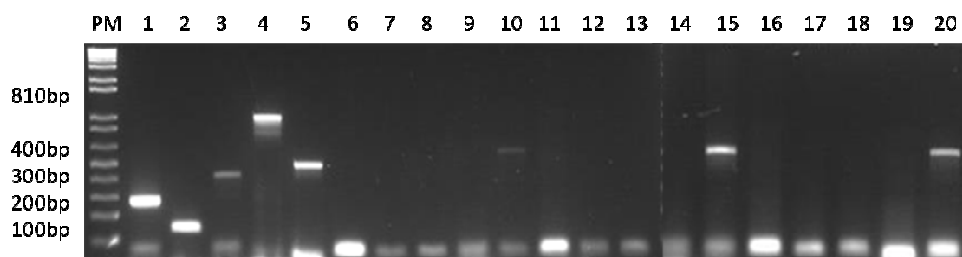


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 2% de produtos da PCR obtidos usando os pares de iniciadores para detecção dos genes que codificam as toxinas: Bin A, Bin B, Mtx1, Mtx2, Mtx3. Canaletas 1 a 5; *B. sphaericus* 2362; Canaleta 6 a 20: amostras coletadas no insetário 1

5.7 Teste de crescimento bacteriano na presença de sanitizantes químicos comerciais

O teste de crescimento bacteriano na presença dos sanitizantes químicos comerciais, realizado através do teste de difusão em ágar, com a cepa BS 2362, indicou resistência ao álcool 70% e água ozonizada (Ozonizador Milli-G) na concentração entre 0,4 e 0,6 ppm. Já em relação ao hipoclorito (1%), ácido peracético (1%) e ácido acético (10%), a cepa BS2362 mostrou-se susceptível, visualizado através da formação de halo ao redor do poço onde foi aplicado o produto (figura 18). Em seguida, foi avaliada a susceptibilidade das estirpes isoladas no presente estudo. Para isto utilizou-se o ácido peracético 1%, já que este tem o melhor custo-benefício. Os resultados mostraram grande variação entre as estirpes testadas, sendo algumas suscetíveis, com a formação de halo de inibição de até 3,1 cm, enquanto outras resistentes (sem formação de halos) (tabela 4). Vale a pena ressaltar, que algumas estirpes consideradas moderadamente sensíveis, foi possível observar uma diminuição da densidade das colônias, próximo ao poço onde foi aplicada a substância teste. Os resultados obtidos após 24h de incubação das amostras de *Bacillus sphaericus* com a substância teste (plaqueamento em ágar Mueller-Hinton).

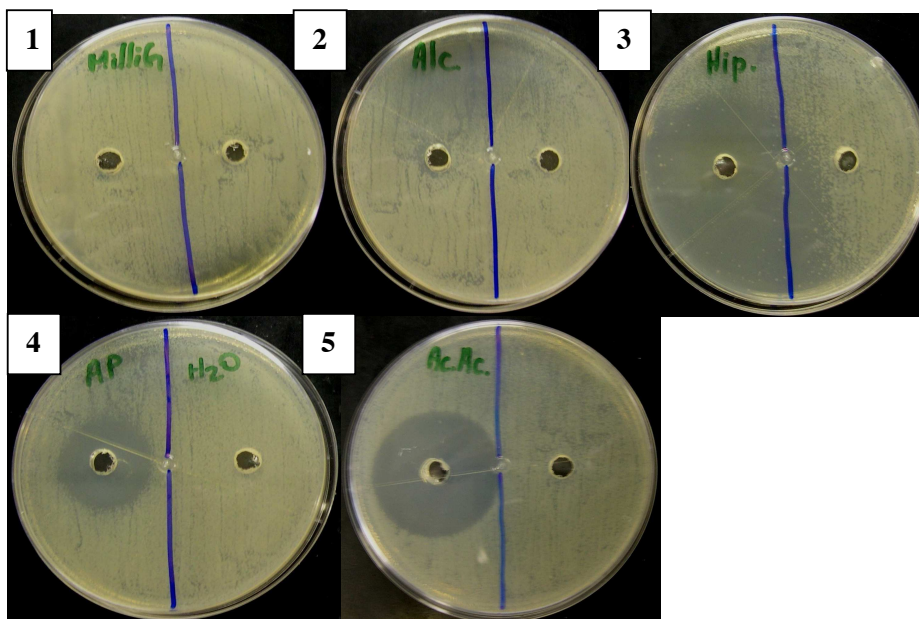


Figura 18. Placas de Agar com a cepa 2362, testadas com: 1) água Mili-G; 2) Álcool 70%; 3) Hipoclorito 1%; 4) Ácido peracético 1%; 5) ácido acético 10%.

As estirpes isoladas no estudo foram classificadas, de acordo com a resposta a ação do ácido peracético a 1%, como: **Sensíveis** = diâmetro da zona de inibição é maior ou não mais do que 3 mm menos que o controle positivo; **Moderadamente sensíveis** = halo maior que 2 mm, mas menor que o controle positivo de mais de 3 mm; **Resistente** = diâmetro igual ou menor que 2 mm (figura 19).

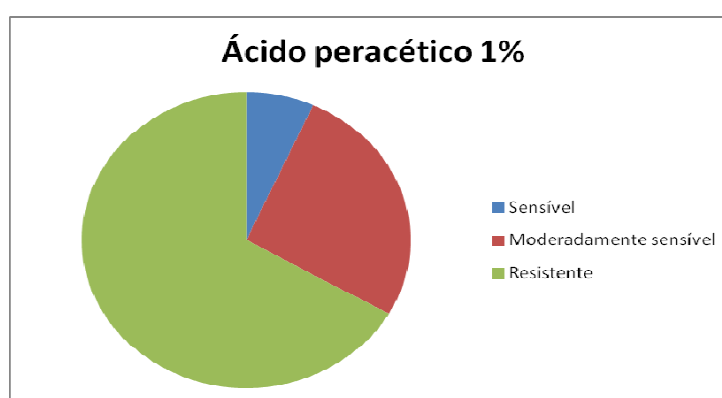


Figura 19. Sensibilidade das estirpes de *Bacillus sphaericus* ao ácido peracético 1%.

Tabela 4: Resistência e/ou suscetibilidade das cepas isoladas frente ao ácido peracético à 1%

Amostra	Espécie	Estirpe	1% ácido peracético	Resistencia / suscetibilidade ao ácido peracético
1	<i>B. sphaericus</i>	LFB-711	3,1	S ³
2	<i>B. sphaericus</i>	2362	1,7	S
3	<i>B. sphaericus</i>	NI404	2,8	S
4	<i>B. sphaericus</i>	Lamal 1	2,8	S
5	<i>B. sphaericus</i>	Lamal 2	2,6	S
6	<i>B. sphaericus</i>	Lamal 3	2,5	S
7	<i>B. sphaericus</i>	Lamal 4	DD ¹	R ⁴
8	<i>B. sphaericus</i>	Lamal 5	DD	R
9	<i>B. sphaericus</i>	Lamal 6	2,4	S
10	<i>B. sphaericus</i>	Lamal 7	2,5	S
11	<i>B. sphaericus</i>	Insetario 2	A ²	R
12	<i>B. sphaericus</i>	Insetario 2	A	R
13	<i>B. sphaericus</i>	Insetário 3	A	R
14	<i>B. cereus</i>	Ração 1	2,2	S
15	<i>B. cereus</i>	Ração 2	2,3	S

1.	DD	Diminuição da densidade das colônias
2.	A	Ausência de halo
3.	S	Suscetível
4.	R	Resistente

5.8 Bioensaio qualitativo para estudo de toxicidade das estirpes isoladas

Após a verificação da toxicidade através da detecção de genes das toxinas pela técnica de PCR, a toxicidade das estirpes foi confirmada através da realização de bioensaio qualitativo. Nesses ensaios, os resultados revelaram diferentes toxicidades entre as estirpes avaliadas. Os bioensaios confirmaram a alta toxicidade da estirpe 2362 para as larvas L3, diferentemente da estirpe LFB-711 e SSII-1, que apresentaram baixa toxicidade (Tabela 4). Conforme esperado, as estirpes de *B. cereus* isoladas da ração das larvas não foram tóxicas para as larvas. Já nas estirpes isoladas no Laboratório de Malária a toxicidade das estirpes de *B. sphaericus* para as larvas de 3º estágio foi alta quando avaliadas em ensaio biológico, assim como aquelas isoladas no insetário 3. Já para as larvas de 4º estágio, as estirpes apresentaram, em sua maioria, média toxicidade. A estirpe isolada no insetário 1 apresentou baixa toxicidade.

Tabela 4. Avaliação qualitativa da atividade biológica das estirpes de *Bacillus sphaericus* isoladas em larvas de *Anopheles aquasalis* de colônias de insetários brasileiros e o perfil de toxinas entomogênicas obtidos por PCR

Espécie	Estirpe	Origem	Fonte de Isolamento/Ano	Toxinas ^a		Mortalidade (%) ^b			
				Gene da toxina Bin	Genes das toxinas Mtx	L3 ^d Média (DP) ^e	Toxicidade	L4 ^d Média (DP) ^e	Toxicidade
<i>B.sphaericus</i>	SSII-1 ^c	Índia	Larvas de <i>Culex fatigans</i> / 1976	-	1	0,0 (0,0)	Baixa	8,4 (5,1)	Baixa
	2362 ^c	Nigéria	Adultos de <i>Simulium damnosum</i> / 1981	A,B	1,2,3	66,7 (26,7)	Alta	42,4 (5,8)	Média
	LFB-711 ^c	Brasil	Solo, Parque Nacional Mte Pascoal, Ba / 1989	A,B	1,2,3	6,7 (6,7)	Baixa	10,1 (9,9)	Baixa
<i>B.sphaericus</i>	LAMAL 1	Insetário Brasil	Bacia de criação <i>A. aquasalis</i> (L3-L4) / Julho-2011	-	1,2,3	83,3 (0,0)	Alta	37,2 (10,6)	Média
	LAMAL 2		Bacia de criação <i>A. aquasalis</i> (L3-L4) /Marco-2009	-	1,2,3	60,0 (16,7)	Alta	30,2 (16,9)	Média
	LAMAL 3		Bacia de larvas mortas <i>A. aquasalis</i> / Junho-2011	-	1,2,3	68,3 (15,0)	Alta	19,1 (4,2)	Média
	LAMAL 4		ND / Fevereiro-2012	-	1,2,3	53,3 (13,3)	Alta	45,6 (22,2)	Média
	LAMAL 5		Balde de água desclorada / Fevereiro-2012	-	1,2,3	58,3 (35,0)	Alta	12,2 (2,2)	Baixa
	LAMAL 6		Bacia de larvas mortas <i>A. aquasalis</i> /Fevereiro-2012	-	1,2,3	63,3 (26,7)	Alta	20,9 (19,1)	Média
	LAMAL 7		Bacia de larvas mortas <i>A. aquasalis</i> /Fevereiro-2012	-	1,2,3	61,7 (11,7)	Alta	55,7 (12,3)	Alta
<i>B.sphaericus</i>	Insetário 3	Insetário Brasil	Bacia de criação <i>A. aquasalis</i> (L3-L4) / Maio-2012	-	1,2,3	55,0 (28,3)	Alta	48,8 (12,1)	Alta
	Insetário 3		Bacia de larvas mortas <i>A. aquasalis</i> / Julho-2012	-	1,2,3	73,3 (13,3)	Alta	20,7 (0,0)	Média
<i>B.sphaericus</i>	Insetário 1	Insetário Brasil	Bacia de criação <i>A. aquasalis</i> (L3-L4) /Marco-2012	-	3	3,3 (3,3)	Baixa	26,7 (26,7)	Média
<i>B. cereus</i>	Colônia Fosca	Ração Tetramin ®	Ração triturada para alimentar as larvas / Junho-2012	-	-	1,7 (1,7)	Baixa	10,0 (10,0)	Baixa
	Colônia Brilhante		Ração triturada para alimentar as larvas / Junho-2012	-	-	0,0 (0,0)	Baixa	1,9 (1,4)	Baixa
Controle Negativo (NaCl 0,85%)	--	--	--	--	--	6,7 (6,7)	--	6,8 (0,1)	--

^a produtos amplificados por técnica de PCR; ^b > 50% de mortalidade larval igual à alta toxicidade; 21% a 50% de mortalidade larval igual à média toxicidade; 0% a 20% de mortalidade larval igual à baixa toxicidade, segundo Oliveira *et al.*, 1989. ^c Cepas cedidas pela LFB/CCGB/FIOCRUZ; ^d Bioensaios realizados em larvas de *A. aquasalis*; ^e Média de dois ensaios e Desvio padrão (DP); ND = Não Determinado

6 Discussão

No presente trabalho, com o monitoramento da colônia de *An. aquasalis* através da contabilização diária de pupas, foi possível observar que em alguns períodos ocorria uma queda significativa na produção, relacionadas à mortalidade excessiva de larvas, principalmente no estágio L3 e L4. Achados semelhantes foram descritos por outros autores, utilizando diferentes espécies de mosquitos, nos quais as larvas L3 e L4 mostraram-se mais suscetíveis aos bacilos entomopatogênicos (Consoli et al., 1995). Assim, o presente trabalho buscou inicialmente a caracterização morfológica das larvas mortas ou danificadas em busca da possível *causa mortis*. Algumas larvas de *An. aquasalis* apresentaram, em um primeiro momento, alterações nos movimentos, seguido de escurecimento gradual na região dorsal acompanhando o tubo intestinal. Em um estudo realizado para testar a atividade da estirpe de *Bacillus sphaericus* 2362 contra larvas de *Culex quinquefasciatus*, Mulla e colaboradores (1991) descreveram características semelhantes das larvas. Estes autores descreveram como aberração mais comum (15% das larvas) uma região de alongamento entre a cabeça e o tórax (assemelhando-se a um “pescoço”), com ou sem a presença de uma projeção transparente torácica ântero-bulbosa. Assim, outras alterações foram categorizadas pelos mesmos autores como: i) larvas encurtadas; ii) larva com formato normal, mas pintadas de preto; iii) larvas parcialmente pretas; iv) pré pupas: onde todas as características externas eram de larvas, mas as pupas eram formadas e contidas dentro do exoesqueleto larval (Mulla et al., 1991). No presente estudo, características semelhantes também puderam ser evidenciadas nos cadáveres das larvas da colônia de *An. aquasalis*.

De importância, o aumento da mortalidade de larvas, o atraso no tempo de desenvolvimento larval, assim como a diminuição na taxa de empupação, oviposição e eclosão, podem indicar problemas relacionados à qualidade da água utilizada na manutenção dessas colônias (Aurelie et al., 2007). Em 1964, Kramer revisou os problemas relacionados à contaminação de larvas em colônias de mosquitos mantidas em laboratórios de pesquisas, que levavam a alterações morfológicas, fisiológicas e comportamentais nas larvas de culicídeos. Dentre essas ocorrências, a contaminação por *Streptococcus*, espiroquetas e microsporídios, que já haviam sido descritos por outros autores (Christophers and SR, 1960; JETTMAR, 1947; LAIRD, 1959). Dentro desse contexto, o mais importante parece ser a observação, na rotina de criação, de alterações associadas à mortalidade das larvas e às características dessas quanto à sua morfologia e comportamento. Dessa forma, a qualidade da água parece ser

essencial para o sucesso da colônia de culicídeos, já que através dela são veiculados diversos microrganismos que podem interferir no desenvolvimento das larvas e constituir um elemento crítico na manutenção de colônias de anofelinos.

No presente trabalho, as amostras coletadas de recipientes de armazenamento de água do insetário, submetidas ao plaqueamento em meio de cultura sólido, logo após o tratamento térmico, revelaram a presença de colônias bacterianas, sugerindo a presença de esporos termorresistentes na água, já que as formas vegetativas não resistem à esse processo (Yousten et al., 1992). As colônias obtidas no ágar obtiveram características semelhantes, mas de tamanhos variados aparentemente dependentes da concentração de colônias na placa. A característica das colônias obtidas com a aplicação do protocolo de choque térmico sugeriu se tratar de *Bacillus* sp.

Bacillus thuringiensis e *Bacillus sphaericus* são duas bactérias de grande importância em controle biológico de insetos. Ambos são bastonetes Gram positivos, da família Bacillaceae. As células vegetativas de *B. sphaericus* medem de 0,6 a 1,0 μm de largura por 1,5 a 7,0 μm de comprimento. Em determinadas condições podem formar esporos com 0,7 a 1,2 μm , na posição subterminal ou terminal. A presença do esporo é responsável pela deformação do esporângio, que adquire o formato de raquete como consequência (Claus & Berkeley, 1974; Habib & Andrade, 1998). No presente trabalho, essas formas puderam ser observadas com frequência, tanto nas lâminas preparadas a fresco quanto nas lâminas coradas pela técnica de Gram. Também, através da contagem das unidades formadoras de colônias presentes na placa foi possível identificar focos de disseminação da contaminação encontrada. Assim, a visualização microscópica das formas vegetativas e esporângio permitiu a identificação da espécie de bacilo, como *B. sphaericus* nas diversas amostras de água coletadas no insetário do Laboratório de Malária. A água utilizada na manutenção da colônia é proveniente da rede de abastecimento de água de Belo Horizonte e, para a criação das larvas é necessária sua decoloração. Para isso, a água da torneira é filtrada (filtro de 3 μm), armazenada e oxigenada com o auxílio de um oxigenador utilizado em aquários por um período de 24h. Só após esse processo, a água pode ser utilizada na criação. A maioria das estirpes de bacilos entomopatogênicos é geralmente isolada do solo (Brownbridge and Margalit, 1987; da Silva et al., 1999; Rodrigues et al., 1998; Weiser and Prasertphon, 1984) ou de seus hospedeiros (Cavados et al., 2001; Orduz-Peralta et al., 1992). No entanto, esporos de bacilos também podem ser facilmente encontrados em ambiente aquático e esses podem resistir em diversos tipos de água e em temperaturas variadas, podendo permanecer em água filtrada, armazenada

entre 15 °C e 30 °C por mais de 200 dias, bom como em água salina (20% de salinidade) por mais de 100 dias (Yousten et al., 1992).

No insetário do Laboratório de Malária, as larvas são mantidas em ambiente onde a temperatura é controlada e deve variar entre 26 °C e 29 °C, que é também a faixa de temperatura ideal para crescimento e cultivo de *B. sphaericus*. Já foi descrito que *B. sphaericus* tem a capacidade de se reciclar nos cadáveres das larvas, através da produção de esporos termorresistentes (Labib and Mohamad, 2003). O número de células vegetativas pode aumentar rapidamente nestes cadáveres, resultando em um aumento da concentração destas bactérias em até 20 vezes no intestino larval. Este fenômeno acontece tanto para a espécie de *Culex* quanto para a espécie de *Anopheles* estudadas. Assim, as cubas de criação, uma vez contaminadas, funcionam como verdadeiros “criadouros” dessas bactérias, que encontram ambiente totalmente favorável ao seu desenvolvimento e persistência no ambiente, já que seus esporos e células vegetativas podem se aderir facilmente às superfícies através da formação de biofilmes. Biofilmes são populações de microrganismos aderentes que são presos em uma matriz exopolissacarídea. Muitas bactérias viáveis e metabolicamente ativas podem se prender eficientemente a estas superfícies (Jayaraman et al., 1997). Nossos resultados confirmaram que a maior concentração de bactérias foi encontrada nas cubas de criação. Neste contexto, o presente trabalho parece ser pioneiro, já que até hoje não se tem registro na literatura da ocorrência de contaminação natural por bacilos entomopatogênicos em colônias de mosquitos mantidas em insetário. Partindo desse princípio, procurou-se também investigar a presença desses bacilos em outras colônias de anofelinos estabelecidas no Brasil. Os resultados apontaram que a contaminação também ocorria em outros insetários, o que levava também a mortalidade excessiva de larvas (informação pessoal). Dos três insetários investigados, dois apresentaram contaminação por *Bacillus sphaericus*. Entretanto, a contaminação nesses locais foi inferior aquela encontrada no insetário do Laboratório de Malária do CPqRR. Além disso, o perfil de toxinas das estirpes isoladas foi também distinto entre os insetários estudados. A(s) razão(zões) para estas diferenças encontradas entre os insetários são ainda desconhecidas. Apesar disto, pode se especular que as diferenças observadas possam estar associadas ao tempo de contaminação dessas colônias, isto é, colônias recentemente infectadas apresentam provavelmente uma menor concentração de bacilos que aquelas com contaminação mais antiga, já que os esporos dos bacilos tendem a permanecer aderidos em substratos, se mantendo no ambiente por mais tempo, e também se proliferam rapidamente no intestino das larvas. Entretanto, como ainda existem poucos insetários mantendo colônias de anofelinos no

Brasil, fazem-se necessários estudos futuros para saber quão frequente é a contaminação por bacilos entomopatogênicos em colônias de mosquitos neotropicais.

Na investigação da presença de bacilos na ração utilizada para alimentação das larvas, nossos resultados identificaram a presença de *Bacillus cereus*. Esta bactéria é uma espécie cosmopolita, sendo considerada como saprófita de solo, mas também encontrada em alimentos de origem animal e vegetal, particularmente em produtos lácteos. As colônias desta espécie podem ser identificadas por apresentarem forma irregular, esbranquiçadas e geralmente brilhantes (Vilas-Bôas et al., 2007). No entanto, apesar de *B. cereus* ser patogênica ao homem e responsável por episódios de intoxicação alimentar, as estirpes de *B. cereus* não possuem atividade entomopatogênica, o que pode ser confirmado através da PCR a qual os fragmentos não foram amplificados. Nos ensaios biológicos as estirpes também se mostraram atóxicas para as larvas.

A toxicidade das cepas de *B. sphaericus* para as larvas de culicídeos está na sua capacidade de produzir toxinas entomopatogênicas. Por causa da presença das toxinas, além das alterações morfológicas, a contaminação por bacilos pode levar a efeitos histopatológicos e citopatológicos da larva, tais como, lesões intestinais, do sistema nervoso central e músculo esquelético, levando consequentemente a alterações na motilidade (Charles, 1987; Oliveira et al., 2009; Singh and Gill, 1988). De fato, durante o presente estudo foi possível observar alterações no movimento das larvas contaminadas, que podem sugerir que essas sejam causadas pela ação das toxinas de *B. sphaericus*. As inclusões cristalinas formadas no momento da esporulação contêm proteínas que são produzidas sob a forma de prótoxinas, as quais são transformadas em peptídeos tóxicos no intestino do inseto, pela ação do pH alcalino intestinal e de proteases. A toxina ativada causa a lise das células epiteliais e a morte das larvas (Singh and Gill, 1988). No entanto, nem todas as estirpes são capazes de produzir estas toxinas, já tendo sido identificadas estirpes que não produzem nenhuma toxina (Aquino de Muro et al., 1992), enquanto outras que produzem tanto toxinas de cristal (Bin) quanto toxinas de membrana (Mtx) (da Silva et al., 1999).

As primeiras estirpes entomopatogênicas descritas de *B. sphaericus* foram isoladas na Califórnia a partir de larvas de *Culiseta incidens* (Diptera: Culicidae) e foram chamadas de estirpes K e Q (Kellen et al., 1965). Posteriormente, revelou-se que essas estirpes não apresentavam as toxinas de cristal sendo classificadas por isso como de baixa toxicidade. Atualmente, diversas estirpes são conhecidas produtoras das toxinas de cristal e muitos

trabalhos estão utilizam as estirpes 1593 e 2362, isoladas, respectivamente, na Indonésia (Singer, 1973) e na Nigéria (Weiser, 1984). A estirpe 2362 tem servido como amostra de referência na maioria dos produtos comerciais à base de *B. sphaericus*, indicados, principalmente, para o controle de mosquitos dos gêneros *Culex* e *Anopheles* (Alves et al., 2006; Castro et al., 2002; Medeiros et al., 2005). Isto porque esta estirpe apresenta as toxinas de cristal, que são extremamente tóxicas para as larvas de mosquitos (El-Bendary et al., 2005; Stray et al., 1988). Já foi descrito por outros autores que a toxicidade das estirpes pode variar também em relação aos seus hospedeiros, já que a ação das toxinas Bin está relacionada à presença de receptores específicos no intestino das larvas (Silva-Filha et al., 1997). Entretanto, pouco se sabe sobre a forma de ação das toxinas Mtx e a presença desses receptores em mosquitos anofelinos. Estudos moleculares revelaram que a toxidade da Mtx2 pode variar entre as estirpes pela mudança de apenas 4 a 8 bases na sequência de aminoácidos dos genes dessas toxinas, e que essas pequenas alterações podem refletir na variada toxicidade dessas estirpes entre as diferentes espécies de mosquitos (Chan et al., 1996). Através dos resultados obtidos na PCR das estirpes isoladas no LAMAL, foi possível observar apenas o perfil de toxinas Mtx, no entanto a toxicidade dessas estirpes variou de média a alta quando desafiadas em ensaio biológico. Esses resultados mostraram que as toxinas Mtx presentes nas amostras isoladas de insetários de criação tiveram de média a alta toxicidade para larvas de 3º estágio de *Anopheles aquasalis* e baixa a média nas larvas de 4º estágio. Outros estudos também identificaram diferença de toxicidade entre os estádios larvais, muitas vezes atribuídos ao fato de as larvas de 4º estágio alimentar menos do que as larvas de 3º estágio (Rodrigues et al., 1999).

Diante da problemática aqui apresentada, um dos fatores mais críticos envolvidos na contaminação de colônias de mosquitos por bacilos entomopatogênicos parece ser a sua capacidade de permanecer no ambiente, seja através da reciclagem no organismo das larvas mortas, seja pela formação de biofilmes ou pela capacidade desses microrganismos em formar esporos termorresistentes. Assim, algumas alternativas podem ser avaliadas para implantação na rotina de manutenção como: higienização eficiente das bacias de criação para eliminação dos focos de contaminação e persistência dos bacilos na colônia; a instalação de filtros de 0,45 μm que permitissem a retenção de esporos. Assim, faz-se necessário utilizar um produto desinfetante e/ou esterilizante que não seja tóxico para o manipulador e para as larvas, de fácil enxágue, econômico, de aplicação rápida e que não deixe resíduo. Sanitizantes são compostos, geralmente químicos, que matam formas vegetativas e/ou esporuladas de microrganismos patogênicos. A sanitização química é um meio muito empregado na

higienização de equipamentos e/ou ambiente de indústrias alimentícias e farmacêuticas e sistemas de saúde (Ceccanti et al., 2011; Tolleson et al., 2012). A utilização dos sanitizantes está relacionada ao tipo de amostra, a espécie de organismos e ao grau de contaminação. Diversos são os sanitizantes utilizados para esse fim como: compostos à base de cloro, iodo, peróxido de hidrogênio, ácido peracético e quaternário de amônio. Esses produtos devem ser aprovados através de testes laboratoriais, nas condições recomendadas pelos fabricantes (Beltrame *et al.*, 2012). Um bom sanitizante, além de matar microrganismos, deve possuir outras características de acordo com o objetivo de sua aplicação. Visando o controle químico da contaminação através da higienização das bacias de criação de larvas, estudos preliminares foram realizados para testar três sanitizantes químicos comerciais (álcool 70%, hipoclorito 1%, ácido peracético 1% e ácido acético 10%), todos nas diluições recomendadas pelo fabricante. Com exceção do álcool 70%, os outros três compostos foram capazes de formar um halo de inibição específico (> 2 cm) contra a com a estirpe 2362, usada como referência. No entanto, hipoclorito e ácido acético, nas diluições utilizadas, são inviáveis para na rotina do insetário, seja pela alta toxicidade e/ou custo elevado. Já o ácido peracético a 1% inibiu cerca de 50% das amostras testadas (Anexo III). Este composto é produzido por uma reação química entre o peróxido de hidrogênio e ácido acético e, em solução aquosa mata esporos bacterianos e age contra a formação de biofilmes bacterianos (Kauppinen et al., 2012). Devido ao seu alto poder oxidante, o ácido peracético promove a oxidação dos componentes celulares, agindo sobre a membrana citoplasmática, desativando as funções fisiológicas, por exemplo, a barreira osmótica. Como consequência, o ácido peracético tem sido utilizado em esterilização de materiais hospitalares e na indústria alimentícia e farmacêutica. Assim, acredita-se que este composto pode ser promissor como sanitizante em insetários de experimentação. Portanto, como perspectiva deste trabalho, pretende-se realizar estudos mais criteriosos para viabilizar este e outros compostos no insetário do Lamal, com o objetivo de prevenir contra futuras contaminações por microrganismos como os bacilos.

7 Conclusões

- A identificação morfológica e molecular das estirpes isoladas do insetário do Laboratório de Malária permitiu identificar a presença de *Bacillus sphaericus* na colônia de criação de *Anopheles aquasalis*;
- No insetário do Laboratório de Malária, a água utilizada na criação das larvas de *Anopheles aquasalis* foi responsável pela veiculação dos esporos de *Bacillus sphaericus* e o armazenamento de água, no processo de descloração, favoreceu a ativação dos esporos em células vegetativas;
- A comparação inter-insetários permitiu comprovar que a contaminação por *B. sphaericus* estava presente em 3 dos 4 insetários estudados;
- O perfil de toxinas de *B. sphaericus* variou entre as estirpes isoladas nos diferentes insetários, sendo que apenas as da família Mtx foram identificadas nas amostras investigadas;
- As larvas de 3º estágio mostraram-se mais suscetíveis às estirpes de *B. sphaericus* do que as larvas de 4º estágio;
- As toxinas Mtx1, Mtx2 e Mtx3 de *B. sphaericus* foram identificadas nas estirpes isoladas em dois dos três insetários com contaminação, sendo altamente tóxicas para as larvas de 3º estágio de *Anopheles aquasalis*;

ANEXO I

Licença CEUA: LW 49/2010



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-49/10

Certificamos que o protocolo (P-30/10-3), intitulado "Manutenção de insetário para estudos da interação de patógenos e seus mosquitos vetores", sob a responsabilidade de LUCIANO ANDRADE MOREIRA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 29/11/2014 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 384 Fêmeas de Swiss webster, Idade: 6 Semana(s), Peso: 20,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 29 de novembro de 2010

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br

ANEXO II

REGISTRO DIÁRIO DE PUPAS COLETADAS *Anopheles aquasalis*

Ano:		Número de pupas	Técnico responsável	Rubrica
Mês:				
Dia	1			
	2			
	3			
	4			
	5			
	6			
	7			
	8			
	9			
	10			
	11			
	12			
	13			
	14			
	15			
	16			
	17			
	18			
	19			
	20			
	21			
	22			
	23			
	24			
	25			
	26			
	27			
	28			
	29			
	30			
	31			

LAMAL-11 Anexo A Rev 02

8 Referências Bibliográficas:

- Alves, L.F., Alves, S.B., Lopes, J., Lopes, R.B., 2006. [Evaluation of isolates and a new granular formulation of *Bacillus sphaericus* Neide for control of mosquitoes]. *Neotrop Entomol* 35, 493-499.
- Andrade, F., 1992. Susceptibilidade de *Anopheles triannulatus* (NIVA & PINTO, 1922) e espécies não alvo a larvicidas à base de Temephos e de *Bacillus Thuringiensis* H-14. *Acta Amazonica* 22, 604.
- Aquino de Muro, M., Mitchell, W.J., Priest, F.G., 1992. Differentiation of mosquito-pathogenic strains of *Bacillus sphaericus* from non-toxic varieties by ribosomal RNA gene restriction patterns. *J Gen Microbiol* 138, 1159-1166.
- Arapinis, C., de la Torre, F., Szulmajster, J., 1988. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *Bacillus sphaericus* 1593M gene encoding a 51.4 kD polypeptide which acts synergistically with the 42 kD protein for expression of the larvicidal toxin. *Nucleic Acids Res* 16, 7731.
- Armstrong, J.A., 1958. The susceptibility of adult female *Anopheles gambiae* to insecticides in East Africa. *Bull World Health Organ* 19, 1105-1109.
- Arruda, M.E., Rios, R.I., Arantes, P.C., Oliveira, A.C., Nascimento, L.P., 1982. Manutenção em laboratório de *Anopheles albitarsis* e *Anopheles aquasalis* por copulacao induzida. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 77, 89-91.
- Aurelie, F.D., Jean, M., Lebel, T.J., 2007. Influence of water type and commercial diets on the production of *Anopheles gambiae* Giles, under laboratory conditions. *Pak J Biol Sci* 10, 280-286.
- Baumann, L., Broadwell, A.H., Baumann, P., 1988. Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4- and 41.9-kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. *J Bacteriol* 170, 2045-2050.
- Baumann, P., Baumann, L., Bowditch, R.D., Broadwell, A.H., 1987. Cloning of the gene for the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* 2362: evidence for a family of related sequences. *J Bacteriol* 169, 4061-4067.
- Baumann, P., Unterman, B.M., Baumann, L., Broadwell, A.H., Abbene, S.J., Bowditch, R.D., 1985. Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. *J Bacteriol* 163, 738-747.
- Bergo, E.S., Buralli, G.M., Santos, J.L., Gurgel, S.M., 1990. [Evaluation of larval development of *Anopheles darlingi* (Diptera-Culicidae) raised in the laboratory on different diets]. *Rev Saude Publica* 24, 95-100.
- Berry, C., Hindley, J., 1987. *Bacillus sphaericus* strain 2362: identification and nucleotide sequence of the 41.9 kDa toxin gene. *Nucleic Acids Res* 15, 5891.
- Berry, C., Jackson-Yap, J., Oei, C., Hindley, J., 1989. Nucleotide sequence of two toxin genes from *Bacillus sphaericus* IAB59: sequence comparisons between five highly toxinogenic strains. *Nucleic Acids Res* 17, 7516.

Berti, J., Zimmerman, R., Amarista, J., 1993. Adult abundance, biting behavior and parity of *Anopheles aquasalis*, Curry 1932 in two malarious areas of Sucre State, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88, 363-369.

Blandin, S., Moita, L.F., Köcher, T., Wilm, M., Kafatos, F.C., Levashina, E.A., 2002. Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the Defensin gene. *EMBO Rep* 3, 852-856.

Brownbridge, M., Margalit, J., 1987. Mosquito active strains of *Bacillus sphaericus* isolated from soil and mud samples collected in Israel. *J Invertebr Pathol* 50, 106-112.

Buralli, G.M., Bergo, E.S., 1988. [Maintenance of *Anopheles darlingi* Root, 1926 colony, in the laboratory]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 30, 157-164.

Castro, S.D., Colombi, E., Flores, L.N., Canales, D., 2002. [Biolarvicide *Bacillus sphaericus*-2362(GRISELESF) for the control of malaria in a health area of the Republic of Honduras]. *Rev Cubana Med Trop* 54, 134-141.

Cavados, C.F., Fonseca, R.N., Chaves, J.Q., Rabinovitch, L., Araújo-Coutinho, C.J., 2001. Identification of entomopathogenic *Bacillus* isolated from *Simulium* (Diptera, Simuliidae) larvae and adults. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96, 1017-1021.

Ceccanti, S., Giampieri, S., Burgalassi, S., 2011. Carrier tests to assess the effective sporicidal concentration of a liquid chemical disinfectant for a sanitization program. *PDA J Pharm Sci Technol* 65, 372-379.

Chan, S.W., Thanabalu, T., Wee, B.Y., Porter, A.G., 1996. Unusual amino acid determinants of host range in the Mtx2 family of mosquitocidal toxins. *J Biol Chem* 271, 14183-14187.

Charles, J.F., 1987. Ultrastructural midgut events in Culicidae larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spore/crystal complex. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 138, 471-484.

Charles, J.F., Nielson-LeRoux, C., Delécluse, A., 1996. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. *Annu Rev Entomol* 41, 451-472.

Charles, J.F., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Humphreys, M.J., Berry, C., 1997. Binding of the 51- and 42-kDa individual components from the *Bacillus sphaericus* crystal toxin to mosquito larval midgut membranes from *Culex* and *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae). *FEMS Microbiol Lett* 156, 153-159.

Christophers, SR, 1960. *Spirochaetes*, in: Press, C.U. (Ed.), *Aedes aegypti* (L.) the yellow' fever mosquito. Cambridge University Press, London & New York.

Claus D and Berkeley CW. The genus *Bacillus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2. Sneath PHA (Ed). Williams, Wilkins, Baltimore. 34: 1105-1139, 1986.

COLUZZI, M., 1964. MAINTENANCE OF LABORATORY COLONIES OF ANOPHELES MOSQUITOS. *Bull World Health Organ* 31, 441-443.

Consoli, R.A., Carvalho-Pinto, C.J., Oliveira, M.A., Santos, B.S., Lamounier, M.A., Alves, R.S., Silva, C.M., Rabinovitch, L., 1995. Some environmental and biological factors

influencing the activity of entomopathogenic *Bacillus* on mosquito larvae in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 90, 121-124.

Consoli, R.A.G.B., Oliveira, R.L.d., 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Costa, E.L.N., Luch, o.P.R., Fritz, L.L., Fiuza, L.M., 2009/2010. Artrópodes e Bactérias Entomopatogênicas, *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília/DF, p. 68.

Da Silva, A.N., Dos Santos, C.C., Lacerda, R.N., Santa Rosa, E.P., De Souza, R.T., Galiza, D., Sucupira, I., Conn, J.E., Póvoa, M.M., 2006. Laboratory colonization of *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) in Belém, Pará, Brazil. J Med Entomol 43, 107-109.

Da Silva, A.N., Santos, C.C., Lacerda, R.N., Machado, R.L., Póvoa, M.M., 2006. Susceptibility of *Anopheles aquasalis* and *an. darlingi* to *Plasmodium vivax* VK210 and VK247. Mem Inst Oswaldo Cruz 101, 547-550.

Da Silva, K.R., Rabinovitch, L., Seldin, L., 1999. Phenotypic and genetic diversity among *Bacillus sphaericus* strains isolated in Brazil, potentially useful as biological control agents against mosquito larvae. Res Microbiol 150, 153-160.

Davidson, E.W., 1979. Ultrastructure of midgut events in the pathogenesis of *Bacillus sphaericus* strain SSII-1 infections of *Culex pipiens quinquefasciatus* larvae. Can J Microbiol 25, 178-184.

Davis, J.R., 1994. Laboratory methods for the conduct of experimental malaria challenge of volunteers. Vaccine 12, 321-327.

De Barjac, H., 1978. [A new variety of *Bacillus thuringiensis* very toxic to mosquitoes: *B. thuringiensis* var. *israelensis* serotype 14]. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D 286, 797-800.

Despommier, G., Hotez, Knirsch, 2005. Parasitic Diseases, Fifth Edition ed.

Diop, A., Faye, O., Molez, J.F., 1998. [Establishing a strain of *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in an insectarium]. Bull Soc Pathol Exot 91, 340-343.

El-Bendary, M., Priest, F.G., Charles, J.F., Mitchell, W.J., 2005. Crystal protein synthesis is dependent on early sporulation gene expression in *Bacillus sphaericus*. FEMS Microbiol Lett 252, 51-56.

Faran, M., 1980. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXIV. A revision of the *Albimanus* Section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. Contributions of the American Entomological Institute 15, 1-215.

Fleming, G., 1992. Biología y ecología de los vectores de la malaria en las Américas, in: Washington, D.O.P.d.I.S., 1986. (Eds.).

Flores-Mendoza, C., Cunha, R.A., Rocha, D.S., Lourenço-de-Oliveira, R., 1996. [Identification of food sources of *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) by precipitin test in the State of Rio de Janeiro, Brazil]. Rev Saude Publica 30, 129-134.

Forattini, O., 2002. Culicidologia Médica, São Paulo.

- Forattini, O.P., 1973. *Entomologia médica*, São Paulo.
- G., F., 1992. Biología y ecología de los vectores de la malaria en las Américas, in: Washington, D.O.P.d.I.S., 1986. (Eds.).
- Galardo, A.K., Zimmerman, R.H., Lounibos, L.P., Young, L.J., Galardo, C.D., Arruda, M., D'Almeida Couto, A.A., 2009. Seasonal abundance of anopheline mosquitoes and their association with rainfall and malaria along the Matapí River, Amapá, [corrected] Brazil. *Med Vet Entomol* 23, 335-349.
- Galvão, A.L.A., Damasceno, R.G., Marques, A.P., 1942. Algumas observações sobre a biologia dos anofelinos de importância epidemiológica de Belem, Pará, *Memórias do Instituto Evandro Chagas: Parasitologia*, Rio de Janeiro.
- Giglioli, G., 1947. Laboratory colony of *Anopheles darlingi*. *J Natl Malar Soc* 6, 159-164.
- Girod, R., Roux, E., Berger, F., Stefani, A., Gaborit, P., Carinci, R., Issaly, J., Carme, B., Dusfour, I., 2011. Unravelling the relationships between *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) densities, environmental factors and malaria incidence: understanding the variable patterns of malarial transmission in French Guiana (South America). *Ann Trop Med Parasitol* 105, 107-122.
- Hindley, J., Berry, C., 1987. Identification, cloning and sequence analysis of the *Bacillus sphaericus* 1593 41.9 kD larvicidal toxin gene. *Mol Microbiol* 1, 187-194.
- Hindley, J., Berry, C., 1988. *Bacillus sphaericus* strain 2297: nucleotide sequence of 41.9 kDa toxin gene. *Nucleic Acids Res* 16, 4168.
- Horosko, S., Lima, J.B., Brandolini, M.B., 1997. Establishment of a free-mating colony of *Anopheles albiparvus* from Brazil. *J Am Mosq Control Assoc* 13, 95-96.
- Hucker, G.J., 1921. A New Modification and Application of the Gram Stain. *J Bacteriol* 6, 395-397.
- Hunt, R.H., Gunders, A.E., 1990. The susceptibility of five laboratory colonies of mosquitoes to the human nematode *Wuchereria bancrofti* (Cobbold). *Ann Trop Med Parasitol* 84, 381-386.
- Jagtap, S.C., Jagtap, C.B., Kumar, P., Srivastava, R.B., 2009. Detection of *Bacillus sphaericus* mosquitocidal toxin genes by multiplex colony PCR. *Can J Microbiol* 55, 207-209.
- Jettmar, H.M., 1947. [Not Available]. *Wien Med Wochenschr* 97, 465-467.
- Kalfon, A., Charles, J.F., Bourguin, C., de Barjac, H., 1984. Sporulation of *Bacillus sphaericus* 2297: an electron microscope study of crystal-like inclusion biogenesis and toxicity to mosquito larvae. *J Gen Microbiol* 130, 893-900.
- Kauppinen, A., Ikonen, J., Pursiainen, A., Pitkänen, T., Miettinen, I.T., 2012. Decontamination of a drinking water pipeline system contaminated with adenovirus and *Escherichia coli* utilizing peracetic acid and chlorine. *J Water Health* 10, 406-418.
- Kellen, W.R., Clark, T.B., Lindegren, J.E., Ho, B.C., Rogoff, M.H., Singer, S., 1965. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. *J Invertebr Pathol* 7, 442-448.

Klein, T.A., Lima, J.B., Toda-Tang, A., 1990. Colonization and maintenance of *Anopheles deaneorum* in Brazil. J Am Mosq Control Assoc 6, 510-513.

Krych, V., Johnson, J., AA, 1980. Deoxyribonucleic Acid Homologies Among Strains of *Bacillus sphaericus* International Journal of Systematic Bacteriology 30, 476-484.

Labib, I.M., Mohamad, A.A., 2003. Laboratory evaluation of *Bacillus sphaericus* recycling in mosquito larvae. J Egypt Soc Parasitol 33, 425-436.

Lacey, L.A., 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. J Am Mosq Control Assoc 23, 133-163.

Laird, M., 1959. Biological solutions to problems arising from the use of modern insecticides in the field of public health. Acta Trop 16, 331-355.

Lima, A.S.d.S., 2009. Aspectos Básicos do Desenvolvimento e da Reprodução los Laboratório de *Anopheles* neotropicais, vetores da malária., Instituto Oswaldo Cruz (IOC-Fiocruz). Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, p. 72.

Lima, J.B., Valle, D., Peixoto, A.A., 2004. Adaptation of a South American malaria vector to laboratory colonization suggests faster-male evolution for mating ability. BMC Evol Biol 4, 12.

Liu, J.W., Hindley, J., Porter, A.G., Priest, F.G., 1993. New high-toxicity mosquitocidal strains of *Bacillus sphaericus* lacking a 100-kilodalton-toxin gene. Appl Environ Microbiol 59, 3470-3473.

Liu, J.W., Porter, A.G., Wee, B.Y., Thanabalu, T., 1996. New gene from nine *Bacillus sphaericus* strains encoding highly conserved 35.8-kilodalton mosquitocidal toxins. Appl Environ Microbiol 62, 2174-2176.

Liu, L.Z., Song, Z.C., Feng, C.Y., Huang, F.S., Chen, F.Z., 1987. Establishment of a natural mating colony of *Anopheles dirus* Peyton ET Harrison and their biological characteristics. Chin Med J (Engl) 100, 230-233.

Manonmani, A.M., Hoti, S.L., Balaraman, K., 1990. Characterization & larvicidal activity of indigenous isolates of *Bacillus sphaericus* from natural breeding habitats. Indian J Med Res 91, 223-227.

Martens, P., Hall, L., 2000. Malaria on the move: human population movement and malaria transmission. Emerg Infect Dis 6, 103-109.

Medeiros, F.P., Santos, M.A., Regis, L., Rios, E.M., Rolim Neto, P.J., 2005. Development of a *Bacillus sphaericus* tablet formulation and its evaluation as a larvicide in the biological control of *Culex quinquefasciatus*. Mem Inst Oswaldo Cruz 100, 431-434.

Melo, POMPÍLIO, T.P.R., 2010. Base molecular da interação da toxina binária do biolarvívica *Bacillus sphaericus* com α -glicosidasas de larvas de culicídeos vetores. Programa de Pós-graduação em Saúde Pública. Centro de Pesquisas Ageu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz, Recife, p. 136.

Moores, H., 1953. A method for maintaining a colony of *Anopheles gambiae* in the laboratory. Trans R Soc Trop Med Hyg 47, 321-323.

Moreira, L.A., Ito, J., Ghosh, A., Devenport, M., Zieler, H., Abraham, E.G., Crisanti, A., Nolan, T., Catteruccia, F., Jacobs-Lorena, M., 2002. Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. *J Biol Chem* 277, 40839-40843.

Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J.A., Lu, G., Pyke, A.T., Hedges, L.M., Rocha, B.C., Hall-Mendelin, S., Day, A., Riegler, M., Hugo, L.E., Johnson, K.N., Kay, B.H., McGraw, E.A., van den Hurk, A.F., Ryan, P.A., O'Neill, S.L., 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell* 139, 1268-1278.

Mpofu, S.M., Masendu, H.T., Kanyimo, K.H., Mtetwa, C., 1993. Laboratory colonization of *Anopheles quadriannulatus* from sympatry with other sibling species of the *Anopheles gambiae* complex in Zimbabwe. *Med Vet Entomol* 7, 122-126.

Mulla, M.S., Rodcharoen, J., Ngamsuk, W., Tawatsin, A., Pan-Urai, P., Thavara, U., 1997. Field trials with *Bacillus sphaericus* formulations against polluted water mosquitoes in a suburban area of Bangkok, Thailand. *J Am Mosq Control Assoc* 13, 297-304.

Mulla, M.S., Singh, N., Darwazeh, H.A., 1991. Delayed mortality and morphogenetic anomalies induced in *Culex quinquefasciatus* by the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. *J Am Mosq Control Assoc* 7, 412-419.

Myers, P.S., Yousten, A.A., 1980. Localization of a mosquito-larval toxin of *Bacillus sphaericus* 1593. *Appl Environ Microbiol* 39, 1205-1211.

Nielsen-Leroux, C., Charles, J.F., 1992. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. *Eur J Biochem* 210, 585-590.

Oliveira, C.D., Tadei, W.P., Abdalla, F.C., 2009. Occurrence of apocrine secretion in the larval gut epithelial cells of *Aedes aegypti* L., *Anopheles albitalis* Lynch-Arribálzaga and *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae): a defense strategy against infection by *Bacillus sphaericus* Neide? *Neotrop Entomol* 38, 624-631.

Oliveira, E., da Silva, S., Rabinovitch, L., 1998. A Standardized Protocol for the rapid detection of gelatin hydrolysis by *Bacillus sphaericus*. *Israel Journal of Entomology* XXXII, 141-146.

Oliveira-Ferreira, J., Lacerda, M.V., Brasil, P., Ladislau, J.L., Tauil, P.L., Daniel-Ribeiro, C.T., 2010. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J* 9, 115.

Oliveira-Ferreira, J., Nakaie, C.R., Daniel-Ribeiro, C., 1992. Low frequency of anti-*Plasmodium falciparum* circumsporozoite repeat antibodies and rate of high malaria transmission in endemic areas of Rondonia State in northwestern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 46, 720-726.

Omardeen, T.A., Kellett, F.R., Gillette, H.P., 1957. Precipitin studies on *Anopheles aquasalis* Curry, the coastal vector of malaria in Trinidad, B.W.I. *West Indian Med J* 6, 204-214.

Ordúz-Peralta, S., Diaz, T., Restrepo, N., Rojas, W., Yousten, A.A., 1992. Isolation and characterization of four new strains of *Bacillus sphaericus* from central Nigeria highly toxic to mosquito larvae. *J Invertebr Pathol* 60, 107-108.

Rodrigues, I.B., Tadei, W.P., Dias, J.M., 1998. Studies on the *Bacillus sphaericus* larvicidal activity against malarial vector species in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93, 441-444.

Rodrigues, I.B., Tadei, W.P., Dias, J.M., 1999. Larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* 2362 against *Anopheles nuneztovari*, *Anopheles darlingi* and *Anopheles braziliensis* (Diptera, Culicidae). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 41, 101-105.

Rosa-Freitas, M.G., Lourenço-de-Oliveira, R., de Carvalho-Pinto, C.J., Flores-Mendoza, C., Silva-do-Nascimento, T.F., 1998. Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93, 651-655.

Rubio-Palis, Y., Zimmerman, R.H., 1997. Ecoregional classification of malaria vectors in the neotropics. *J Med Entomol* 34, 499-510.

Saraiva, M., Amorim, R., Moura, M., Martinez-Espinosa, FE, B., MG, V., f., 2009. Expansão urbana e distribuição espacial da malária no município de Manaus, Estado do Amazonas., *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, pp. 515-522.

Schenkel, R.G., Nicolas, L., Frachon, E., Hamon, S., 1992. Characterization and toxicity to mosquito larvae of four *Bacillus sphaericus* strains isolated from Brazilian soils. *J Invertebr Pathol* 60, 10-14.

SENIOR WHITE, R.A., 1951a. Studies on the bionomics of *Anopheles aquasalis* Curry, 1932. Part I. *Indian J Malariol* 5, 293-404.

SENIOR WHITE, R.A., 1951b. Studies on the bionomics of *Anopheles aquasalis* Curry, 1932. *Indian J Malariol* 5, 465-512.

SHUTE, G.T., 1956. A method of maintaining colonies of East African strains of *Anopheles gambiae*. *Ann Trop Med Parasitol* 50, 92-94.

Silva-Filha, M.H., Nielsen-Leroux, C., Charles, J.F., 1997. Binding kinetics of *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush-border membranes of *Anopheles* and *Culex* sp. mosquito larvae. *Eur J Biochem* 247, 754-761.

Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 1999. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Insect Biochem Mol Biol* 29, 711-721.

Singh, B., Kim Sung, L., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S.S., Cox-Singh, J., Thomas, A., Conway, D.J., 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 363, 1017-1024.

Singh, G.J., Gill, S.S., 1988. An electron microscope study of the toxic action of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larvae. *J Invertebr Pathol* 52, 237-247.

Sinka, M.E., Bangs, M.J., Manguin, S., Coetzee, M., Mbogo, C.M., Hemingway, J., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Kabaria, C.W., Okara, R.M., Van Boeckel, T., Godfray, H.C., Harbach, R.E., Hay, S.I., 2010. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit Vectors* 3, 117.

Stray, J.E., Klowden, M.J., Hurlbert, R.E., 1988. Toxicity of *Bacillus sphaericus* crystal toxin to adult mosquitoes. *Appl Environ Microbiol* 54, 2320-2321.

SVS, S.d.V.e.S.M., 2007. Guia de Vigilância Epidemiológica.

SVS, S.d.V.e.S.M., 2012. Guia de Vigilância Epidemiológica.

Thanabalu, T., Hindley, J., Brenner, S., Oei, C., Berry, C., 1992. Expression of the mosquitocidal toxins of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* by recombinant *Caulobacter crescentus*, a vehicle for biological control of aquatic insect larvae. *Appl Environ Microbiol* 58, 905-910.

Thanabalu, T., Hindley, J., Jackson-Yap, J., Berry, C., 1991. Cloning, sequencing, and expression of a gene encoding a 100-kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. *J Bacteriol* 173, 2776-2785.

Thanabalu, T., Porter, A.G., 1995. Efficient expression of a 100-kilodalton mosquitocidal toxin in protease-deficient recombinant *Bacillus sphaericus*. *Appl Environ Microbiol* 61, 4031-4036.

Tinelli, R., de Barjac, H., Bourgouin, C., 1980. [Isolation of a spore fraction of *Bacillus sphaericus* toxic for larvae of *Anopheles*]. *C R Seances Acad Sci D* 291, 537-539.

Tolleson, W.H., Jackson, L.S., Triplett, O.A., Aluri, B., Cappozzo, J., Banaszewski, K., Chang, C.W., Nguyen, K.T., 2012. Chemical inactivation of protein toxins on food contact surfaces. *J Agric Food Chem* 60, 6627-6640.

Ueno, H.M., Forattini, O.P., Kakitani, I., 2007. [Vertical and seasonal distribution of *Anopheles* (Kerteszia) in Ilha Comprida, Southeastern Brazil]. *Rev Saude Publica* 41, 269-275.

Vilarinhos, P.T., Monnerat, R., 2004. Larvicidal persistence of formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to control larval *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc* 20, 311-314.

Vilas-Bôas, G.T., Peruca, A.P., Arantes, O.M., 2007. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol* 53, 673-687.

Wang, S., Ghosh, A.K., Bongio, N., Stebbings, K.A., Lampe, D.J., Jacobs-Lorena, M., 2012. Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 12734-12739.

Weiser, J., Prasertphon, S., 1984. Entomopathogenic spore-formers from soil samples of mosquito habitats in northern Nigeria. *Zentralbl Mikrobiol* 139, 49-55.

WHO, 2011. World malaria report : 2011. World Health Organization, Suíça, p. 248.

Wijman, J.G.E., Leeuw, P.P.L.A.d., Moezelaar, R., Zwietering, M.H., Abee, T., 2007. Air-Liquid Interface Biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, Sporulation, and Dispersion., *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 1481-1488.

Xavier, M.M., Rebêlo, J.M., 1999. [Species of *Anopheles* (Culicidae, Anophelinae) in a malaria-endemic area, Maranhão, Brazil]. *Rev Saude Publica* 33, 535-541.

Yousten, A.A., 1984. *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. *Adv Biotechnol Processes* 3, 315-343.

Yousten, A.A., Davidson, E.W., 1982. Ultrastructural Analysis of Spores and Parasporal Crystals Formed by *Bacillus sphaericus* 2297. *Appl Environ Microbiol* 44, 1449-1455.

Yousten, A.A., de Barjac, H., Hedrick, J., Cosmao Dumanoir, V., Myers, P., 1980. Comparison between bacteriophage typing and serotyping for the differentiation of *Bacillus sphaericus* strains. *Ann Microbiol (Paris)* 131B, 297-308.

Yousten, A.A., Genthner, F.J., Benfield, E.F., 1992. Fate of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis in the aquatic environment. *J Am Mosq Control Assoc* 8, 143-148.

Yuan, Z., Cai, Q., Andrup, L., Eilenberg, J., Pang, Y., 2001. [Detection of enterotoxin genes in *Bacillus thuringiensis* by PCR]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 41, 148-154.

Yuan, Z., Hansen, B.M., Andrup, L., Eilenberg, J., 2002. Detection of enterotoxin genes in mosquito-larvicidal *Bacillus* species. *Curr Microbiol* 45, 221-225.

Zerpa, N., Moreno, J., Gonzalez, J., Noya, O., 1998. Colonization and laboratory maintenance of *Anopheles albimanus* Wiedemann in Venezuela. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 40, 173-176.