

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES  
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

ELOÍNA MARIA DE MENDONÇA SANTOS

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE UM BIOLARVICIDA À BASE DE *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) E *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* (Bti) PARA CONTROLE DE *Culex quinquefasciatus* E *Aedes aegypti* EM CAMPO

RECIFE

2017

**ELOÍNA MARIA DE MENDONÇA SANTOS**

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE UM BIOLARVICIDA À BASE DE *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) E *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* (Bti) PARA CONTROLE DE *Culex quinquefasciatus* E *Aedes aegypti* EM CAMPO**

Tese apresentada ao curso de doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do título de Doutor em ciências.

Orientadora: Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira  
Coorientadora: Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha

RECIFE

2017

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

- 
- S237a Santos, Eloína Maria de Mendonça.  
Avaliação do impacto de um biolarvicida à base de *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) e *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) para controle de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* / Eloína Maria de Mendonça Santos. - Recife: [s.n.], 2017.  
220 p. : il., graf., tab.
- Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.  
Orientadora: Cláudia Maria Fontes de Oliveira.  
Coorientadora: Maria Helena Neves Silva Filha.
1. *Aedes*. 2. *Culex*. 3. *Bacillus thuringiensis*. 4. Controle biológico de vetores. I. Oliveira, Cláudia Maria Fontes de. II. Silva Filha, Maria Helena Neves. III. Título.

---

CDU 616.92

**ELOÍNA MARIA DE MENDONÇA SANTOS**

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE UM BIOLARVICIDA À BASE DE *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) e *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) PARA CONTROLE DE *Culex quinquefasciatus* E *Aedes aegypti* em campo.

Tese apresentada ao curso de doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do título de Doutor em ciências.

**Aprovada em: 20/02/2017**

**Banca Examinadora**

---

Dr. Simão Vasconcelos  
Universidade Federal de Pernambuco/UFRPE  
(Membro externo)

---

Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompilio de Melo  
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE  
(Membro externo)

---

Dra. Milena Paiva  
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE  
(Membro interno)

---

Dra. Zuma Medeiros  
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE  
(Membro interno)

---

Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira  
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE  
(Orientadora)

Dedico esse trabalho a minha mãe Eva Mendonça.

E ao meu Tio Eloi Mendonça.

## AGRADECIMENTOS

Ao universo e a divindade pela oportunidade.

À minha família pelo incentivo.

À minha orientadora Cláudia Fontes, pelo incentivo, dedicação, amizade e carinho durante todos esses anos. Você contribuiu e contribui de forma imensurável para a minha formação acadêmica. Admiro muito você.

À minha também orientadora Maria Helena (Chica), pela orientação, sempre presente durante toda a etapa do estudo em que sua participação foi fundamental. Meu muito obrigada!

À Dra. Lêda Regis pelas valiosas contribuições, pela sua disponibilidade e carinho, tens minha admiração desde sempre.

Aos membros da banca, Dra. Milena Paiva, Dra. Zulma Medeiros, Dra. Tatiany Romão, Dr. Simão Vasconcelos, Dr. Danilo Carvalho e Dra. Rosângela Barbosa pela participação e valiosas considerações feitas neste trabalho.

Aos amigos de laboratório, pela amizade e colaboração na realização desse trabalho, de maneira especial a Tatiane Cibele, Diogo Chalegre e Lígia Ferreira, Morgana Xavier, Danielle Varjal, Larissa Maciel, Tatiana Teodoro, Larissa (Russa), Diego, Elisama, Nathaly, Darleide, Tatiane Alexandre, Alessandra Albuquerque, Susane Alves, Heverly Suzany.

A Juliana Correia pela parceria, amizade, companheirismo, você me fez conhecer o significado da palavra irmandade. Eu te amo!

A minha irmã Laura Leal, a moleca mais inteligente que todas! Minha Doutora, favorita, por compartilhar comigo todos os momentos mesmo a distância! Eu te amo.

Ao amor da minha vida, Bruno que se faz luz e alegria em quase todos os dias, e ainda me deu duas bençãos em forma de gente, Francisco Filgueiras e Esther Filgueiras. Vocês me ajudam a enxergar a leveza da vida; me mostrando diariamente o que realmente importa em nossa caminhada.

À Prefeitura do Recife pelo apoio operacional.

Aos agentes de campo José Ribeiro e Edmar pelo apoio na realização desse trabalho.

Aos moradores do bairro de Água Fria que autorizaram a utilização de suas casas para a coletas de mosquitos.

À Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do IAM-Fiocruz-PE, de maneira especial a Dra. Constância Ayres por sua determinação em tornar realidade essa Pós-graduação.

Ao NTP- Núcleo de Plataformas Tecnológicas pelas análises

Ao Departamento de Entomologia do Instituto Aggeu Magalhães.

À SUMITOMO e Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia e pelo incentivo financeiro custeando esse projeto e a bolsa de doutorado, respectivamente.

“Você não sabe o quanto eu caminhei  
Pra chegar até aqui  
Percorri milhas e milhas antes de dormir  
Eu não cochilei  
Os mais belos montes escalei  
Nas noites escuras de frio chorei...”

(A estrada- Cidade Negra)



SANTOS, E.M.M. **Avaliação do impacto de um biolarvicida à base de *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) e *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) para controle de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* em campo.** 2017. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

## RESUMO

Produtos larvicidas à base de bactérias entomopatogênicas são seletivos e têm sido utilizados com sucesso para o controle de culicídeos e simúlideos de importância médica. Nessa perspectiva, um biolarvicida composto por cristais inseticidas de *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) e *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), VectoMax<sup>®</sup> CG, foi avaliado em relação a sua eficácia para o controle de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* em áreas urbanas, bem como avaliado seu impacto na suscetibilidade de *C. quinquefasciatus* a Lsp. O estudo foi conduzido no bairro de Água Fria, Recife-PE que já vinha tratando seus criadouros bimensalmente com larvicidas a base de Lsp (VectoLex<sup>®</sup> G) e de Bti (VectoBac<sup>®</sup> G). A região foi dividida na área 1 (A1) onde o esquema foi mantido e na área 2 (A2), onde os produtos foram substituídos pelo VectoMax<sup>®</sup>. Índices entomológicos durante o período de pré-intervenção foram analisados a partir da densidade de adultos/formas jovens. Além da avaliação da suscetibilidade de *C. quinquefasciatus* a Lsp. Durante os três anos de intervenção, esses levantamentos entomológicos foram mantidos. Após o primeiro ano, houve uma redução no número de adultos de *C. quinquefasciatus* nas duas áreas ( $p=0<0,0005$ ), atingindo uma queda de 43,83% (A1) e 61,86% (A2) comparado ao período de pré-intervenção. A suscetibilidade de *C. quinquefasciatus* a Lsp não apresentou perda, as razões de resistência apresentaram flutuações inferiores a 10 vezes, em ambas as áreas, na maioria das avaliações. Os alelos que conferem resistência a Lsp tiveram uma frequência de 0,057 antes da intervenção, ao longo do tratamento, a frequência na A2 foi inferior (0,069) à A1 (0,088), sugerindo que o uso do VectoMax<sup>®</sup> desfavoreceu a seleção destes alelos. Desta forma, a utilização do produto conjugado Lsp+Bti, ofereceu vantagens como um maior impacto no controle de *C. quinquefasciatus*, menor potencial de seleção de resistência, além de vantagens logísticas pelo uso de um único produto.

Palavras-chave: *Aedes*. *Culex*. *Bacillus thuringiensis*. Controle biológico de vetores.

SANTOS, E.M.M. Evaluation of the impact of a biolarvicide based on *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) and *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for control of *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* in the field. 2017. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

## ABSTRACT

Larvicidal products based on entomopathogenic bacteria are selective and have been successfully used for controlling culicidae and simuliids of medical importance. From this perspective, a the effectiveness biolarvicide composed of insecticidal crystals of *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) and *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), VectoMax® WSP, was evaluated for controlling the *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* in urban areas, as well as its impact on the susceptibility of *C. quinquefasciatus* to Lsp. The study was conducted in the neighborhood of Água Fria, Recife-PE, which had been treating its breeding grounds bi-monthly with larvicides based on Lsp (VectoLex® G) and Bti (VectoBac® G). The region was divided into area 1 (A1) where the scheme was maintained and in area 2 (A2), where the products were replaced by VectoMax®. Entomological indices during the pre-intervention period were performed from the density of adults young forms. In addition the susceptibility of *C. quinquefasciatus* to Lsp was also evaluated. During the three years of intervention, these entomological surveys were maintained. After the first year, there was a reduction in the number of adults of *C. quinquefasciatus* in both areas ( $p = 0 < 0.0005$ ), reaching a decrease of 43.83% (A1) and 61.86% (A2) compared to the pre-intervention. The susceptibility of *C. quinquefasciatus* to Lsp showed no loss, the resistance ratios showed fluctuations less than 10 times, in both areas, in most evaluations. The alleles conferring resistance to Lsp had a frequency of 0.057 before the intervention, throughout the treatment, the frequency at A2 was lower (0.069) than A1 (0.088), suggesting that the use of VectoMax® disadvantaged the selection of such alleles. In this way, the use of the Lsp + Bti conjugated product offered advantages such as greater impact on *C. quinquefasciatus* control, less resistance selection potential, and logistic advantages due to the use of a single product.

Keywords: *Aedes*. *Culex*. *Bacillus thuringiensis*. Controle biológico de vetores.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Modo de ação da toxina Binária presente nos cristais de *Lysinibacillus sphaericus* em larvas de *Culex quinquefasciatus*. **34**
- Figura 2-** Representação do gene que codifica o receptor Cqm1 em *Culex quinquefasciatus* (número de acesso no GenBank DQ333335) e localização dos polimorfismos dos alelos *cqm1*<sub>REC</sub>, *cqm1*<sub>REC-D16</sub> e *cqm1*<sub>REC-D25</sub>. **38**
- Figura 3-** Esquema metodológico **50**
- Figura 4-** Localização da área de estudo, cidade do Recife, em destaque o bairro de Água Fria. **51**
- Figura 5-** Áreas de estudo no bairro de Água Fria, (Recife), onde os criadouros da A1 foram tratados com Vectobac<sup>®</sup> G (Bti) e na A2 com o conjugado Vectolex<sup>®</sup> G (Lsp) na VectoMax<sup>®</sup> CG (Lsp+Bti) na área 2. **52**
- Figura 6-** Aspirador Manual (Modelo = Horst Ltda-Me, São Paulo, BR) utilizado para coleta de mosquitos. **55**
- Figura 7-** Coleta de formas imaturas de culicídeos em fossas, através do método *dipping* **56**
- Figura 8-** Armadilha (BR-OVT) para a coleta de jangadas (ovos) de *Culex quinquefasciatus* **58**
- Figura 9-** Consumo de biolarvicidas e superfície tratada no bairro de Água Fria nas áreas 1 (VectoBac<sup>®</sup>- Bti e VectoLex<sup>®</sup> G ) e 2 (VectoMax<sup>®</sup> WSP ) durante os primeiros 12 Ciclos de avaliação **61**
- Figura 10-** Análise de Variância (ANOVA) do número de *Culex quinquefasciatus* adultos coletados durante o pré-intervenção e intervenção (ano 1, 2 e 3) no Bairro de Água Fria, Recife-PE. **64**

- Figura 11-** Densidade de *Culex quinquefasciatus* e precipitação na A1 e A2. A2. Criadouros foram tratados com VectoLex<sup>®</sup> G (Lsp) e VectoMax<sup>®</sup> CG (Lsp+Bti) respectivamente. **65**
- Figura 12-** Densidade de *Aedes aegypti* adulto e precipitação mensal registrada nas áreas A1 e A2 de estudo. **71**
- Figura 13-** Densidade de ovos de *Aedes aegypti* durante os períodos de intervenção nas duas áreas de estudo, A1 e A2. Os sítios de oviposição de *A. aegypti* foram tratados com VectoBac WG<sup>®</sup> (Bti) e VectoMax<sup>®</sup> WSP (Lsp + Bti) em A1 e A2, respectivamente. **73**
- Figura 14-** Separação eletroforética de fragmentos a partir de alelos do gene *cqm1* de *Culex quinquefasciatus* do bairro de Água-Fria, Recife-PE amplificados por PCR. **78**
- Figura 15-** Frequência dos alelos de resistência *cqm1*<sub>REC-D19</sub>, *cqm1*<sub>REC-D16</sub>, *cqm1*<sub>REC-D25</sub>, em larvas do 4<sup>o</sup> instar de *Culex quinquefasciatus* nas áreas 1 e 2 no bairro de Água Fria, Recife- PE, determinada através de reação de PCR alelo-específica. **79**
- Figura 16-** Percentuais de genótipos (%) para o gene *cqm1* em larvas do 4<sup>o</sup> instar de *Culex quinquefasciatus* nas áreas 1 e 2 no bairro de Água Fria, Recife-PE, determinada através de reação de PCR alelo-específica. A) Avaliação no período de pré-intervenção e intervenção (M2-M5); B) Avaliação global. **81**

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1-** Alelos de resistência do gene *cqm1/cpm1* do complexo *Culex pipens* associados a resistência à toxina Bin de *Lysinibacillus sphaericus*. **37**
- Quadro 2-** Frequência de alelos do gene *cqm1* em populações de *Culex quinquefasciatus* determinados por PCR. Nd - não determinado. **39**
- Quadro 3-** Produtos à base de *Lysinibacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis* ser. *israelensis*, apresentado sob a forma de grânulos utilizados para controle de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, em duas áreas de estudo, no bairro de Água Fria, Recife-PE. **52**
- Quadro 4 -** Sinopse dos índices entomológicos de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*, utilizados para a execução do projeto no bairro de Água Fria, Recife-PE. **57**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Criadouros de *Aedes aegypti* e de *Culex quinquefasciatus* descritos nas A1 e A2 de Água Fria, Recife, Brazil, no período de maio 2010 a abril 2012 e média de larvicidas VectoLex<sup>®</sup>G, Vectobac <sup>®</sup> G, Vectobac <sup>®</sup> WDG ou VectoMax<sup>®</sup> CG utilizados por ciclo de tratamento nas áreas de estudo. **62**
- Tabela 2-** Número médio e desvio padrão de ovos  $\pm$  DP de ovos (jangadas), larvas e pupas e adultos de *C. quinquefasciatus* nas áreas 1 e 2, realizados no bairro de Água Fria, Recife-PE, detectadas no período pré intervenção e durante a intervenção (Ano 1, 2, 3). **68**
- Tabela 3-** Percentual de coletas positivas para presença de *Culex quinquefasciatus* nas áreas (A1 e A2), no bairro de Água Fria, Recife-PE, utilizando diferentes índices para coleta em períodos de pré-intervenção (PI) e intervenção durante três anos (1, 2, 3). **70**
- Tabela 4-** Número de larvas e pupas de *Aedes aegypti* coletadas em criadouros preferencialmente colonizados por *Culex quinquefasciatus* em Água Fria, Recife-PE. **76**
- Tabela 5-** Susceptibilidade de larvas de 4<sup>o</sup> instar de *Culex quinquefasciatus* ao *Lysinibacillus sphaericus* SPH88 (Instituto Pasteur). **80**
- Tabela 6 -** Frequência dos alelos de resistência do *cqm1* em larvas de *Culex quinquefasciatus* nas áreas 1 e 2 do bairro de Água Fria, Recife-PE, coletados durante a pré-intervenção e durante cinco momentos de tratamento (M1-M5). **82**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1	Área 1 de estudo
A2	Área 2 de estudo
Bin	Toxina binária de <i>Lysinibacillus sphaericus</i>
BinA	Toxina binária de Lsp responsável pela toxicidade às células
BinB	Toxina binária de Lsp que reconhece e se liga a receptores específicos no epitélio intestinal das larvas
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> svar. <i>israelensis</i>
cDNA	DNA complementar
CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub>	Concentrações letais de compostos para 50 e 90% dos indivíduos expostos
Cpm1	<i>Culex pipiens</i> maltase 1
Cqm1	<i>Culex quinquefasciatus</i> maltase 1
CqSF	Colônia de laboratório de <i>Culex quinquefasciatus</i> susceptível a Lsp
CVA	Centro de Vigilância Ambiental
DA	Densidade de adultos
DLP	Densidade de larvas e pupas
DO	Densidade de ovos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
DENV-(1-4)	Vírus Dengue sorotipo 1, 2, 3 ou 4.
FL	Filariose Linfática
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
kDa	Kilo Dáton
Lsp	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>
L1, L2, L3, L4	Estádios larvais 1, 2, 3 e 4
Mtx	Toxinas mosquitocidas
PGEFG	Programa Global de Eliminação da Filariose Linfática
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue

PNEFL	Programa Nacional de Eliminação da Filariose Linfática
IA	Ingrediente Ativo
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
Pb	pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PE	Pernambuco
Pg	Picograma
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucleico
RR	Razão de Resistência
UTI	Unidade Tóxica Internacional
ZIKAV	Vírus zika



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	MARCO TEÓRICO	22
2.1	<i>Culex quinquefasciatus</i> : bioecologia	22
2.2	Importância epidemiológica de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	23
2.3	<i>Aedes aegypti</i> : bioecologia	24
2.4	Importância epidemiológica de <i>Aedes aegypti</i> .	25
2.5	Controle de mosquitos	28
2.5.1	<i>Químico</i>	28
2.5.2	<i>Biológico</i> .	30
2.6	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (Lsp)	32
2.6.1	<i>Toxinas e modo de ação</i>	32
2.6.2	<i>Receptores da toxina Bin e resistência</i>	35
2.7	<i>Bacillus thuringiensis</i> svar. <i>israelensis</i> (Bti)	39
2.7.1	<i>Toxinas e modo de ação</i>	40
2.7.2	<i>Receptores e potencial de Resistência</i>	41
2.8	Utilização de Lsp e Bti em campo	42
2.9	Sinergia entre Lsp e Bti e perspectivas de uso combinado	44
3	JUSTIFICATIVA	46
4	PERGUNTA CONDUTORA	47
5	HIPÓTESE	48
6	OBJETIVOS	49
6.1	Objetivo Geral	49
6.2	Objetivos específicos	49
6.2.1	<i>Objetivo secundário</i> .	49
7	PROCEDIMENTO METODOLÓGICO	50
7.1	Área de estudo	50
7.2	Desenho experimental (Intervenção)	52
7.2.1	<i>Operacionalidade</i> .	52
7.3	Amostragem de <i>C. quinquefasciatus</i> e <i>A. aegypti</i>	54
7.3.1	<i>Densidade de adultos</i>	55
7.3.2	<i>Densidade de larvas e pupas</i>	55
7.3.3	<i>Densidade de ovos</i> .	56

7.4 Análise de suscetibilidade de <i>Culex quinquefasciatus</i> a Lsp	57
7.4.1 Análise das amostras	57
7.4.2 Bioensaios	58
7.4.3 PCR para detecção dos alelos de resistência do gene <i>cqm1</i>	58
7.5 ANÁLISES DE DADOS	59
7.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	60
8 RESULTADOS	61
8.1 Operacionalidade	61
8.2 Avaliação dos tratamentos na densidade de <i>Culex quinquefasciatus</i>	63
8.2.1 Adultos	63
8.2.2 Formas pré-imaginais	69
8.2.3 Avaliação de índices entomológicos para detecção de <i>Culex quinquefasciatus</i>	69
8.3 Avaliação dos tratamentos com biolarvicidas sobre a densidade de <i>Aedes aegypti</i>	70
8.3.1 Adultos	70
8.3.2 Ovos	72
8.4 Detecção de alelos do gene <i>cqm1</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> que conferem resistência a <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	75
8.5 Detecção de alelos de <i>Culex quinquefasciatus</i> que conferem resistência a <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	76
8.6 Presença de <i>Aedes aegypti</i> em criadouros preferencialmente colonizados por <i>Culex quinquefasciatus</i>	81
9 DISCUSSÃO	83
9.1 Impacto do controle vetorial	83
9.2 Impacto na suscetibilidade de <i>C. quinquefasciatus</i> a Lsp e frequência de alelos r	88
10 CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS	93
APÊNDICE A- Artigo publicado	113

## 1 INTRODUÇÃO

Algumas espécies de mosquitos têm a capacidade de transmitir agentes etiológicos de várias doenças causando sérios problemas de saúde pública, além de incômodo à população humana (SERVICE, 2004). Mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* podem ser vetores de agentes causadores de doenças como a malária, filariose linfática, dengue, febres amarela, zika e chikungunya (FOSTER; WALKER, 2009). Durante as últimas décadas, inseticidas químicos têm sido a ferramenta utilizada para o controle populacional de insetos vetores, causando impacto ambiental e afetando a saúde do homem. Além disso, as populações expostas a produtos inseticidas, frequentemente, podem desenvolver resistência depois de um período de tratamento contínuo. A resistência tem sido uma consequência quase inevitável, detectada em escala mundial, em decorrência do uso indiscriminado de inseticidas químicos. Weill et al. (2003), detectaram uma drástica redução na suscetibilidade de mosquitos aos larvicidas das classes dos organofosforados e carbamatos após décadas de exposição a estes compostos.

Uma alternativa para substituição dos agentes químicos nas ações de controle de mosquitos é o uso de produtos à base de bactérias entomopatogênicas como *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) e *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti). Estas bactérias produzem toxinas com ação larvicida seletiva para algumas espécies de mosquitos (LACEY et al., 2015; Organização Mundial de Saúde, 1985;). Biolarvicidas à base de Lsp e Bti têm sido utilizados em programas integrados de controle populacional de mosquitos em diferentes localidades do mundo (LACEY 2007; REGIS et al., 2001). Uma das principais vantagens dos larvicidas biológicos é a sua ação seletiva, sendo assim inócuos à saúde humana e ao meio ambiente (BECKER, 2003; MULLA et al., 1984).

Lsp se caracteriza por possuir uma boa persistência em campo associada à sua capacidade de reciclagem em ambientes ricos em matéria orgânica (BECKER et al., 1995). No entanto, seu modo de ação, dependente da interação de apenas uma toxina (Bin) que possui uma classe específica de receptores presentes no intestino das larvas, favorece a seleção de resistência em populações expostas de forma contínua e exclusiva com este biolarvicida. A espécie *Aedes aegypti* é considerada refratária à Lsp, pois as concentrações capazes de matar suas larvas são entre 100 e 1000 vezes superiores às aquelas usadas para as larvas de *Culex quinquefasciatus*, que é considerada a espécie mais suscetível a Lsp (NIELSEN- LEROUX; CHARLES, 1992). Bti, diferentemente do Lsp, apresenta uma maior sensibilidade à radiação solar e com elevada carga de matéria orgânica, presente em

ambientes aquáticos, que limitam a persistência de sua ação larvicida em certos tipos de criadouros (LACEY, 2007). Por outro lado, o complexo modo de ação de Bti cujos cristais contêm quatro toxinas que atuam em sinergia com diferentes receptores, dificulta o processo de seleção de resistência nas populações de mosquitos expostas (ARAÚJO et al., 2013; FERREIRA; SILVA-FILHA, 2013; GEORGHIOU; WIRTH, 1997). Estudos *in vivo* e *in vitro* mostram que existe uma sinergia de ação entre as toxinas de Lsp e Bti, pois essas toxinas combinadas possuem uma significativa atividade larvicida para colônias de *Culex quinquefasciatus* resistentes a Lsp, demonstrando assim, potencial para superar a resistência à toxina Bin (THIERY et al., 1998; WIRTH et al., 2004). Além disso, estas toxinas associadas apresentam uma ação larvicida para *A. aegypti* (WIRTH et al., 2004). A partir desses achados, foi desenvolvido um produto que possui em sua formulação uma mistura de cristais de Lsp e Bti destinados ao controle de mosquitos (ANDERSON et al., 2011; KAHINDI et al., 2008; MWANGANGI et al., 2011).

O objetivo geral desse estudo foi avaliar o potencial do biolarvicida VectoMax® CG composto por cristais de Lsp e Bti, para o controle de *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* em uma área do bairro de Água Fria, situado no município de Recife, região Nordeste do Brasil. Recife possui condições propícias para a proliferação dessas espécies e a circulação de diferentes agentes etiológicos, fazendo com que as ações de controle conjuntas para as duas espécies sejam essenciais para interromper o ciclo de transmissão de doenças por eles veiculadas. Em Água Fria, programas de controle de vetores vêm sendo executado há mais de 10 anos. Dentre as ações de controle preconizadas, os criadouros de *C. quinquefasciatus* são tratados com um produto larvicida à base de Lsp (VectoLex® G) e os criadouros de *A. aegypti* recebem aplicações com larvicida à base de Bti (VectoBac® G e WDG).

A hipótese desse estudo é de que um produto composto por cristais inseticidas de ambas bacterias Lsp+Bti possa ser usado em substituição aos biolarvicidas que contêm apenas uma das bacterias entomopatogênicas em sua formulação. Esta substituição pode trazer vantagens pela presença de cinco toxinas com mecanismos de ação associados a diferentes receptores e com um espectro de ação mais amplo para espécies de mosquitos. O ganho operacional, também é um fator importante, pois um único produto poderá promover o controle populacional de diferentes espécies no mesmo habitat. A escolha do produto mais adequado para o controle dos mosquitos vetores é essencial para a sustentabilidade dos programas de controle e para reduzir a frequência de transmissão de vírus dengue, febre amarela, zika e chikungunya, além do verme *Wuchereria bancrofti* responsável pela filariose linfática no estado de Pernambuco.

A partir dos dados obtidos nesse estudo foi possível compor dois artigos, o primeiro foi elaborado com os resultados obtidos do impacto do tratamento dos larvicidas sob a densidade de *C. quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* e encontra-se como apêndice dessa tese. O segundo manuscrito será elaborado a partir dos dados de suscetibilidade e frequência de alélos de resistência de *C. quinquefasciatus* a Lsp.

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 *Culex quinquefasciatus*: bioecologia

*Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) é um mosquito cosmopolita, ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Sua distribuição é bastante influenciada pela presença do homem, além de fatores ambientais e climáticos como precipitação e temperatura (ANDRADE; NASCIMENTO, 2010; FORATTINI, 2002; LEISNHAM; LADEAU; JULIANO, 2014). Apresenta comportamento endofílico e antropofílico e suas fêmeas realizam hematofagia preferencialmente no período crepuscular vespertino e à noite (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI et al., 2002). O repasto sanguíneo é essencial para a maturação dos ovos, e este hábito alimentar das fêmeas possibilita a transmissão de patógenos aos hospedeiros humanos, além de causar desconforto e afetar a qualidade de vida dos indivíduos expostos as suas picadas.

As fêmeas realizam a postura de ovos agrupados, em formato de uma jangada, depositada na superfície da água em criadouros de coleções aquáticas, caracterizadas preferencialmente, por elevada carga de matéria orgânica. As larvas de 1º estágio eclodem em 48 horas, e passam por mais três estádios larvais (L1, L2, L3 e L4) com duração média de 24h para cada um deles. A larva de 4º estágio faz a muda para a fase de pupa, e entre 24 a 48 h ocorre a emergência do adulto. Em condições ideais de temperatura (25-27 °C) e umidade (60-80%), o ciclo biológico do ovo até a fase adulta tem duração aproximada de dez dias e a longevidade do adulto pode variar entre 34 a 50 dias, existindo registros de até 90 dias de sobrevivência (RAMAIAH ; DAS, 1992; VIANNA et al., 1996).

Entre os culicídeos, a busca e a escolha pelo criadouro apropriado é um importante fator no processo de oviposição e sucesso reprodutivo (MILLAR et al., 1994; NAVARRO-SILVA et al., 2009), pois esses insetos passam a primeira parte do seu ciclo de vida no ambiente aquático (WACHIRA et al., 2010). Vários fatores influenciam na escolha desse sítio de oviposição, tais como a qualidade da água (HARBISON et al., 2010), incidência de luz (VEZZANI; ALBICÓCCO, 2009), pré-existência de ovos (GANESAN et al., 2006), disponibilidade de alimento e vegetação no local (BARKER et al., 2009). Essas características podem ser decisivas na escolha do sítio de criação de algumas espécies do gênero *Culex*. BECKER (2003) sugere que os gases de substâncias como amônia, metano ou dióxido de carbono, liberados quando o material orgânico entra em decomposição, têm um efeito atraente sobre fêmeas de *C. quinquefasciatus*. Seus ovos agrupados apresentam gotículas do feromônio de agregação de

oviposição (6-eritro-5acetoxo hexadecanóide) que também exerce grande poder atrativo sobre fêmeas que buscam local para realizar suas posturas (GANESAN et al., 2006). Desta forma, populações desses mosquitos se estabelecem com tendência a se agrupar, assim os criadouros desta espécie são caracterizados por uma alta densidade de indivíduos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Devido ao grande potencial de colonização e adaptação em todos os tipos de ambientes aquáticos artificiais, sobretudo aqueles com alto nível de matéria orgânica, *C. quinquefasciatus* possui alta capacidade de proliferar em áreas urbanas com saneamento precário (CONSOLI, 1994; SIMONSEN; MWAKITALU, 2013). O Brasil possui grande número de municípios com condições sanitárias deficientes, como agregações de moradias construídas em áreas alagadiças, adensamento urbano, além de outras características que potencializam o número de criadouros e a capacidade de crescimento populacional do mosquito (ALBUQUERQUE, 1993; SIMONSEN; MWAKITALU, 2013). A cidade do Recife reflete bem as condições descritas acima, pois apenas 42% desse município possui rede de esgoto (PERNAMBUCO, 2004)

## 2.2 Importância epidemiológica de *Culex quinquefasciatus*

No Brasil, o mosquito *C. quinquefasciatus* apresenta importância para a saúde pública por ser vetor do agente causador da filariose linfática bancroftiana (FL) (ALBUQUERQUE, 1993; PERERA et al., 2007). Em outras regiões e países pode atuar também como vetor do vírus do Nilo Ocidental (CIOTA et al., 2014; LUJAN et al., 2014; ZINSER et al., 2004), de encefalites como a St Louis (DIAZ et al., 2013; KRAMER et al., 2008) e do vírus Oropouche (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; FIGUEIREDO, 2007), além dos vírus Mayaro e Rocio. Além disso, estudos realizados no Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM) demonstraram a presença de partículas virais do vírus zika nas glândulas salivares de *C. quinquefasciatus* (GUEDES et al., 2016). Esse achado é mais um motivo de alerta quanto à importância das ações de controle de mosquitos em nosso país.

A FL é uma parasitose que tem origem a partir da infecção causada por um dos seguintes nematódeos: *Brugia timori*, *Brugia malayi* e *Wuchereria bancrofti* (SIMONSEN, 2009). O mosquito *C. quinquefasciatus* é o principal vetor de *W. bancrofti* na Ásia e na África Oriental nas Américas (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE, 2004). A FL chegou ao Brasil através do tráfico de escravos oriundos da África, e o parasita transmitido por *C. quinquefasciatus* se propagou para várias áreas urbanas (SIMONSEN; MWAKITALU, 2013).

Atualmente, os municípios de Recife, Olinda, Jaboatão dos Guararapes e Paulista, situados na Região Metropolitana do Recife (RMR), constituem o único foco endêmico remanescente no Brasil (FONTES et al., 2012; PERNAMBUCO, 2011), e estão inseridos no Programa Nacional de Eliminação da Filariose (PNEFL) conduzido pelo Ministério da Saúde desde 2002 (Secretaria Estadual de Saúde). Este por sua vez, está inserido no Plano Global de Eliminação da Filariose Linfática estabelecido em 1997, que tem como meta a erradicação mundial da doença até 2020 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2000, 2006). Outras cidades que estavam incluídas no PNEFL já receberam certificações de eliminação da FL, como Maceió-AL e Belém-PA (FONTES et al., 2012). Em Recife, as estratégias para eliminação da filariose preconizadas pelo PNEFL, incluem o mapeamento dos focos endêmicos, a administração de medicamentos em massa para a população humana residente nesses focos endêmicos, o tratamento dos criadouros de mosquito com larvicida e ações de manejo ambiental para eliminação de criadouros. A eficácia das ações de eliminação da FL também está sendo avaliada através do xenomonitoramento, utilizando a reação para detecção do DNA do verme filarial (*W. bancrofti*), através de PCR em fêmeas de *C. quinquefasciatus* (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE, 2014).

Estudos recentes apontam que além da circulação das atuais arboviroses, existe um risco real de introdução e transmissão do vírus do Oeste do Nilo em países como Brasil, Peru, Austrália e Nova Zelândia (SAMMY et al., 2016). No Brasil, a presença abundante de *C. quinquefasciatus*, além de altas temperaturas são fatores-chave identificados para a expansão do vírus (ROTH et al., 2010). Assim, o controle vetorial de *C. quinquefasciatus* é uma etapa essencial para reduzir os riscos de epidemias.

### 2.3 *Aedes aegypti* : bioecologia

*Aedes aegypti* pertence à família Culicidae, gênero *Aedes*, subgênero *Stegomyia*. Apresenta ampla distribuição mundial, sendo mais encontrado em regiões tropicais e subtropicais (HALSTEAD, 2008). Vários aspectos da biologia de *A. aegypti* são similares a *C. quinquefasciatus*, tais como curto ciclo de vida, comportamento endofílico e antropofílico. Por outro lado, *A. aegypti* tem hábito diurno, a hematofagia realizada pelas fêmeas para a maturação dos ovos ocorre, preferencialmente, nas primeiras horas da manhã e ao anoitecer. Após a digestão do sangue ingerido, a fêmea realiza a seleção de criadouros para deposição dos ovos, que são postos de forma isolada sobre substratos úmidos em corpos aquáticos, próximos à lâmina d'água (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; CLEMENTS, 1996).



A escolha específica de um local para oviposição é influenciada por vários fatores físicos (CLEMENTS, 1996), comportamentais (FAY et al. 1965; GOMES, SCIAVICO, EIRAS, 2006), ambientais (BEZERRA et al., 2006; COSTA et al., 2008; FADER et al., 2014; KEARNEY et al., 2009) e fisiológicos (MARQUES; MIRANDA, 1992; NAVARRO-SILVA, 2009). Durante a seleção do local para realização de suas posturas, a fêmea pode ser atraída por odores de infusões orgânicas (CADENA; MULLEN, 2007; REITER, AMADOR, COLON, 1991; SANTOS et al., 2010), estímulos visuais e táteis, preferindo ovipositar em ambientes escuros e em substratos úmidos (FAY; PERRY, 1965; GOMES et al., 2006; MUIR; THORNE; KAY, 1992;). A presença de larvas coespecíficas no sítio de oviposição também é um estímulo atrativo para a postura (CHADEE; CORBET, 1993; SERPA et al., 2008; ZAHIRI; TILAK et al., 2005; MANFRED; LEWIS, 1997). Contrariamente a *C. quinquefasciatus*, *A. aegypti* possui o comportamento de distribuir os ovos de uma mesma postura em vários criadouros (HARRIGTON et al., 2001). *A. aegypti* apresentam ainda uma estratégia ecológica de sobrevivência, pois seus ovos resistem à dessecação por vários meses, possibilitando a eclosão de suas larvas posteriormente, quando houver contato com a água (HALSTEAD, 2008; SILVA; SILVA 1999). Essas características ampliam sua distribuição e capacidade de manter-se no ambiente e, conseqüentemente, dos agentes etiológicos que podem ser veiculados pelos adultos (HONÓRIO et al., 2003; RIBEIRO et al., 2006).

A adaptabilidade de se reproduzir nos ambientes doméstico e peridoméstico, somado a sua peculiaridade de ovipositar em recipientes diversos (Ex. latas, vidros, calhas, pneus e vasos de plantas) bem como em reservatórios de uso doméstico (Ex. cisternas, caixas d'água, tonéis) (PENNA, 2003; SERPA et al., 2013), garantem seu sucesso populacional. As áreas caracterizadas por apresentarem baixo índice de qualidade ambiental, e o grau de urbanização estão relacionadas com a presença de criadouros produtivos (MACIEL-DE-FREITAS et al., 2007). Fêmeas de *A. aegypti* têm preferência em fazer a postura em reservatórios de água considerada limpa, porém, tem sido demonstrado a presença de formas imaturas em criadouros com água rica em matéria orgânica, que são criadouros preferenciais de *C. quinquefasciatus* (SANTOS; BARBOSA, 2014; VAREJÃO et al., 2005; VIJAYAKUMAR et al., 2014). As características biológicas desse mosquito dificultam as ações de vigilância e de controle necessárias para reduzir os problemas de saúde pública provocadas por este vetor (BRAGA et al., 2000).

#### 2.4 Importância epidemiológica de *Aedes aegypti*

*A. aegypti* é um importante vetor de patógenos causadores de doenças humanas, destacando-se a febre amarela, dengue, chikungunya e zika. Epidemiologicamente, a febre amarela causada pelo vírus amarílico distinguiu-se em dois tipos, silvestre e urbana. A forma urbana tem como vetor *A. aegypti*, enquanto a rural tem a transmissão realizada por mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabetis*. Essa doença se mantém endêmica ou endozootica nas florestas tropicais da América e África causando, periodicamente, surtos isolados ou epidemias de maior ou menor impacto para a saúde pública (VASCONCELOS, 2003). De acordo com o último boletim da incidência de febre amarela no Brasil realizado entre dezembro/2016 e janeiro/2017, ocorreu um período de re-emergência do vírus da febre amarela na região extra-amazônica, um total de 128 casos humanos foram confirmados. A maior parte dos eventos foi inicialmente registrada na região Centro-Oeste, onde o vírus reemergiu a partir de julho de 2014. Posteriormente, foi observada a dispersão da transmissão nos sentidos Sul e Sudeste do país, quando afetou o estado de Minas Gerais. Os estados prováveis de infecção foram: Goiás, Pará, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Espírito Santo, Bahia, Tocantins (BRASIL, 2017).

O mosquito *Aedes aegypti* também é o vetor do vírus dengue (DENV), pertencente à família Flaviviridae. A dengue é uma arbovirose causada por um dos cinco sorotipos virais (DENV1, DENV2, DENV3, DENV4, DENV5), sendo o quinto sorotipo encontrado na Malásia e apenas recentemente descrito por Normile (2013). A doença pode ocorrer da forma clássica ou evoluir para a forma grave (hemorrágica) podendo levar à morte (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002). As epidemias de dengue no mundo têm sido um problema de saúde pública com estimativa de 50 milhões de novos casos da doença a cada ano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). No Brasil, epidemias ocorrem desde 1981, sendo as principais em 1996, 2002, 2006 e 2010 que correspondem à introdução de novos sorotipos virais. De acordo com dados do Ministério da Saúde, em 2016, foram registrados 1.487.924 casos prováveis de dengue no país, com uma incidência de 727,6 casos/100 mil hab. Na região Sudeste foi registrado o maior número de casos prováveis (855.425 casos; 57,5%) em relação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (323.558 casos; 21,7%), Centro-Oeste (197.033 casos; 13,2%), Sul (73.196 casos; 4,9%) e Norte (38.461 casos; 2,6%). Foram confirmados 609 óbitos por dengue, representando 6,8% dos casos graves ou com sinais de alerta. Também foram registrados no país 38.332 casos prováveis de febre de chikungunya (taxa de incidência de 18,7 casos/100 mil hab.), distribuídos em 696 municípios, dos quais 13.236 (34,5%) foram confirmados. Houve

também confirmação de seis óbitos por febre de chikungunya, nos estados da Bahia, Sergipe, São Paulo e Pernambuco (BRASIL, 2016).

Diversos fatores influenciam a manutenção do ciclo de transmissão destas arboviroses, a intensa e desordenada urbanização gera precárias condições de moradia, de infra-estrutura de coleta de lixo e de saneamento básico (GUBLER, 2002; RIGAU-PEREZ et al., 1998), somados à ineficiente estrutura de abastecimento de água, que estimula o seu armazenamento em domicílios pela população (PENNA, 2003). Esses fatos favorecem o desenvolvimento de condições adequadas para a formação de criadouros de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* (TAUIL, 2001). O aumento da mobilidade mundial das populações humanas, através viagens regionais e internacionais constitui mais um aspecto que favorece a circulação dos vírus e o transporte passivo de vetores (Organização Mundial de Saúde, 2014).

A imunização contra o DENV e o controle vetorial são as principais estratégias para combater a dengue (GYAWALI; BRADBURY; TAYLOR-ROBINSON, 2016). Recentemente, foi desenvolvida e disponibilizada uma vacina registrada (Sanofi- Pasteur) contra os quatro sorotipos virais da dengue (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4). Há também outra vacina trivalente desenvolvida pelo Instituto - Butantã em parceria com NIH- National Institutes of Health) que está em fase de testes clínicos em humanos, sendo a previsão é de que a vacina esteja disponível, gratuitamente, para a população, por intermédio do SUS (Sistema Único de Saúde), a partir de 2019 (PORTER; TENEZA-MORA; RAVIPRAKASH, 2014).

Outra arbovirose que tem levado a uma grande preocupação no Brasil é a infecção causada pelo vírus ZIKA (ZIKV). Sua associação com a síndrome congênita neurológica em recém-nascidos e a síndrome de Guillain-Barré já foram esclarecidas e representa um novo desafio no campo da saúde pública (HAZIN et al., 2016; HEUKELBACH; WERNECK, 2016; MUSSO; GUBLER, 2016). A associação dos casos de microcefalia em recém-nascidos com a infecção de gestantes pelo ZIKV foi apresentada recentemente por meio de imagens e análises virológicas e patológicas fetais (MLAKAR et al., 2016), e confirmada por estudos através da identificação e sequenciamento do ZIKV em líquido amniótico de duas gestantes que tiveram infecção durante a gravidez e fetos com microcefalia (CALVET; DOS SANTOS; SEQUEIRA et al., 2016). A circulação desse vírus no Brasil foi registrada inicialmente nos estados da Bahia e Rio Grande do Norte (CAMPOS et al., 2015). Rapidamente, outros casos de infecção por esse vírus foram confirmados em diferentes estados brasileiros, além de casos reportados na América Latina, Caribe, Estados Unidos e Europa. Quanto a infecções pelo vírus ZIKV em 2016, foram registrados 211.770 casos prováveis no país (taxa de incidência

de 103,6 casos/100 mil hab.), distribuídos em 2.280 municípios, tendo sido confirmados 126.395 (59,7%) casos. A análise da taxa de incidência de casos prováveis, segundo regiões geográficas, demonstra que a região Centro-Oeste apresentou a maior taxa de incidência: 205,3 casos/100 mil hab. Entre os estados destacam-se Mato Grosso (670,0 casos/100 mil hab.), Rio de Janeiro (407,7 casos/100 mil hab.) e Bahia (337,6 casos/100 mil hab.). A Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou um alerta e decretou estado de emergência internacional no período de fevereiro a novembro de 2016 baseado no aumento de incidência de microcefalia em zonas endêmicas para infecções do ZIKV. O município do Recife, no estado de Pernambuco, é um dos locais com maiores números de casos notificados de microcefalia em recém-nascidos associado à infecção por ZIKV nas gestantes (TEIXEIRA et al., 2016). A introdução desta nova arbovirose só potencializa a preocupação com as ações de controle populacional do mosquito *A. aegypti* no estado e no País.

## 2.5 Controle de mosquitos

Uma das maneiras de prevenir doenças causadas por patógenos transmitidos por vetores é realizar ações que reduzam a densidade de seus vetores e, por conseguinte, reduzir o risco de transmissão. Esse controle pode ser realizado com intervenções químicas ou biológicas.

### 2.5.1 Químico

O primeiro inseticida químico usado mundialmente, de forma sistemática e disseminada, foi o organoclorado DDT, utilizado a partir de 1940, principalmente, alguns anos após o final da Segunda Guerra Mundial para combater o mosquito vetor do plasmódio causador da malária. (BECKER, 2003; SAUVÉ; DESROSIERS, 2014). O DDT possui alta ação inseticida e é caracterizado pela sua alta persistência e estabilidade no ambiente. Posteriormente, em 1962, com a publicação do livro “Primavera silenciosa” por Rachel Carson, surgiu uma preocupação quanto ao uso indiscriminado do DDT e suas consequências ambientais na cadeia trófica, pois seu uso passou a prejudicar grupos de animais não-alvo. O DDT foi banido da maioria dos países no mundo, inclusive no Brasil a partir de 1985 avaliando o seu uso na agricultura foi cancelado e em 1998 seu emprego foi proibido em campanhas de saúde pública (ROBERTS; TREN, 2010). Atualmente, ainda é utilizado em alguns países da África para fins agrícolas e de saúde pública, devido aos sérios problemas que ainda atingem aquele continente (YOHANNES et al., 2016). O sítio de ação do DDT é a proteína do canal

de sódio, agindo no desequilíbrio destes íons e como consequência permite a passagem constante e descontrolada do impulso nervoso.

Os organofosforados foram descobertos logo após os organoclorados (CRINNION, 2000), sua ação neurotóxica se dá por contato e ingestão pelos insetos. A estrutura química destes compostos apresenta uma menor estabilidade do que os organoclorados, e conseqüentemente, possuem uma menor persistência no ambiente, porém sua toxicidade aos vertebrados é superior quando comparado para organoclorados (BECKER et al., 2003). Os principais inseticidas representantes desta classe empregados no controle de *A. aegypti* são o malathion/adulticida utilizado de forma focal e o temephos/larvicida. Os carbamatos são derivados do ácido carbâmico, e os principais representantes são o bendiocarb e o propoxur. Foram desenvolvidos a partir de sementes de Calabar (*Physostigma venenosum*). Seu modo de ação é semelhante ao dos inseticidas organofosforados, possuem um amplo espectro de atividade tóxica, com a vantagem de serem mais rapidamente degradados, o que diminui a persistência no ambiente (BRAGA; VALLE, 2007). Para organofosforados e carbamatos, o sítio de ação é a enzima acetilcolinesterase (Ache), cuja função é hidrolisar a acetilcolina, neurotransmissor pertencente às sinapses nervosas, em colina e ácido acético, etapa essencial para cessar o impulso nervoso. Os inseticidas inibem a ação da Ache o que causa o acúmulo da Acetilcolinesterase.

Uma classe de inseticidas de grande importância são os piretróides, que são compostos ésteres análogos sintéticos do ácido crisantêmico (piretróide tipo I) e do ácido pirétrico (piretróide tipo II) isolados de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e de outras espécies relacionadas (DAVIES et al., 2007). O desenvolvimento de inseticidas deste grupo está representado por quatro gerações, na terceira geração (1972 e 1973) a permetrina foi produzida, inicialmente voltada para aplicação agrícola. Na quarta geração houve o desenvolvimento dos inseticidas mais utilizados, que se caracterizam por baixa toxicidade para mamíferos, o que reduz o impacto ambiental, como, por exemplo, a cipermetrina e deltametrina. Este grupo é efetivo em baixas doses e apresenta ação para um amplo espectro de insetos (WARE, 2000). Os piretróides, assim como o DDT, atuam no sistema nervoso do inseto, e tem como sítio o canal de sódio, afetando a sua função (ELLIOTT, 1971; HEMINGWAY et al., 2004; NARAHASHI, 1985; RUIGT et al., 1987; VIJVERBERG; VAN DEN BERCKEN, 1990).

Outra classe de compostos desenvolvidas para o controle de insetos é classificada como reguladores que interferem no desenvolvimento e metamorfose dos insetos (IGR, insect growth regulators). Neste grupo se destacam os análogos ao hormônio juvenil (JHA -

Juvenile Hormone Analogues), como o metopreno e o pyriproxyfen; e os inibidores da síntese de quitina (CSIs – “Chitin Synthesis Inhibitors”), representados principalmente pelos compostos novaluron e diflubenzuron (GRAF, 1993). O metopreno, um dos mais antigos JHA foi registrado em 1975. Dez anos depois, o CSI diflubenzuron, começou a ser testado no controle de mosquitos (ESTRADA; MULLA, 1986). Uma característica comum a estes compostos é não provocar mortalidade imediata das larvas, geralmente há mortalidade no estágio de pupa ou durante a emergência do adulto pois agem causando danos durante o desenvolvimento pré-imaginal dos insetos (GORDON; BURFORD, 1984; MULLA, 1995). Os inibidores da síntese de quitina e atuam impedindo a formação da quitina durante a metamorfose dos insetos. A quitina é o principal componente presente no exoesqueleto dos insetos e é formada por polímeros de N-acetilglucosamina (COHEN, 1987). As larvas podem não resistir ao aumento da pressão interna durante a metamorfose, pela ausência da quitina estruturada, não conseguindo sustentar os músculos durante a muda. Ocorrem também vários acidentes de muda que culminam com a morte das larvas (EISLER, 1992; GROSSCURT et al., 1988; MONDAL; PARWEEN, 2000). Estes compostos apresentam baixa toxicidade para mamíferos, bem como ausência de efeitos mutagênicos e teratogênicos (MONDAL; PARWEEN, 2000). No entanto, afetam adversamente um grande número de artrópodes além de fungos, que possuem quitina em sua formação estrutural. Seu modo de ação se dá principalmente por contato com o tegumento e ingestão (GROSSCURT et al., 1988). Após a avaliação de sua toxicidade, a Organização Mundial de Saúde autorizou seu uso em água de consumo humano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008). Um dos principais problemas do uso de inseticidas químicos é a falta de especificidade, o que limita sua aplicação, pois são atingidas também espécies não-alvo, como predadores naturais, e outros grupos importantes para o equilíbrio ecológico e populacional (BECKER, 2003). Outra dificuldade no uso de inseticidas químicos é a seleção de indivíduos que possuam genes que conferem resistência em populações expostas aos compostos químicos (BOYCE et al., 2013; MACIEL-DE-FREITAS et al., 2014; MARCOMBE et al., 2011). A escolha de estratégias integradas de controle, e ambientalmente seguras, como o controle biológico é uma eficiente alternativa para realizar o controle vetorial de mosquitos.

### *2.5.2 Biológico*

Esse tipo de controle caracteriza-se pela utilização de agentes naturais, no controle do tamanho da uma população alvo. Existem diversos tipos de inimigos naturais de

controle que podem atuar como predadores, parasitoides e parasitas. Alguns predadores, como copépodos, nematoides, macroparasitas têm sido sugeridos e explorados como agentes no controle de mosquitos (LORD et al., 2007; UEJIO et al., 2014). A utilização de peixes também é uma alternativa muito popularizada. Entretanto, estudo de meta-análise levando em consideração vários trabalhos, demonstraram que a utilização desse método de controle é ineficiente na redução da densidade populacional do mosquito vetor do patógeno causador da malária (WALSH et al., 2013). Patógenos de insetos podem também ser utilizados como vírus, fungos e bactérias. Dentre os diferentes grupos de vírus entomopatogênicos, o maior foco em pesquisa é com a família Baculoviridae, principalmente os gêneros: baculoviruses, Alfa, Beta, Gamma e Deltabaculoviruses (MILLER, 1997; MOSCARDI et al., 2011).

A utilização de fungos para o controle de mosquitos adultos tem demonstrado efetividade, para o controle de *Anopheles* (BLANFORD et al., 2005; KIKANKIE et al., 2010; SCHOLTE et al., 2005). Esse tipo de estratégia de controle também disponibiliza um risco bastante reduzido de atingir espécies não - alvo (LACEY et al., 2015). O modo de ação dos fungos entomopatogênicos acontece através da produção de propágulos (geralmente conídios) que em contato com o hospedeiro suscetível, leva o mosquito a morte através do desenvolvimento da micose (LACEY et al., 2015).

Outra alternativa são os biolarvicidas, à base de bactérias entomopatogênicas, como *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) e *Bacillus thuringiensis serv. israelensis* (Bti), por serem eficazes e seguros para o controle de mosquitos (LACEY, 2007; REGIS et al., 2001). Produzem toxinas inseticidas que apresentam atividade específica para algumas espécies de mosquito de importância na saúde pública, maiores detalhes serão discutidos nos itens 2.6 e 2.7.

O spinosad também é uma alternativa de biolarvicida bacteriano composto por metabólitos naturais de *Saccharopolyspora spinosa*. É produzidos sob condições de fermentação aeróbica deste actinomiceto, e são denominadas espinosinas A e D. O spinosad apresenta como vantagem elevada atividade selectiva contra alguns insetos alvo e uma baixa toxicidade para organismos não-alvo, incluindo muitos artrópodes úteis (ANASTAS et al., 1999; MAYES et al., 2003). As espinosinas têm um modo de ação, baseado na ativação dos receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChRs), presentes no sistema nervoso de insetos. Essa ligação ao receptor leva à interrupção da neurotransmissão de acetilcolina. Spinosad também tem efeitos secundários como um agonista do neurotransmissor do ácido  $\gamma$ -amino-

butírico (GABA) e leva o inseto à morte por hiperexcitação do sistema nervoso (SPARKS et al., 2012). O spinosad possui um espectro de ação que inclui grande variedade de espécies de importância agrícola, médica e veterinária. Entretanto, há registros de surgimento da resistência em várias espécies de Diptera (FERGUSON, 2004; HSU; FENG 2006; SCOTT 2003; SU; CHENG 2014), além de insetos de outras ordens como Lepidoptera, Thysanoptera e Hymenoptera (SPARKS et al., 2012). Assim, o manejo da resistência ao spinosad é bastante importante, considerando seu uso a longo prazo (SIEGWART et al., 2015).

## 2.6 *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp)

*Lysinibacillus sphaericus*, anteriormente classificado taxonomicamente como *Bacillus sphaericus* (AHMED et al., 2007), é uma bactéria gram positiva com distribuição cosmopolita. A primeira cepa com atividade larvicida foi identificada em larvas de *Culiseta incidens* (KELLEN et al., 1965). A partir dessa descoberta outras cepas foram isoladas em diferentes regiões, incluindo a 1593 (Indonésia); 2297 (Sri Lanka); 2362 (Nigéria); C3-41(China). Essas cepas possuem alta atividade larvicida e vêm sendo empregadas para a produção de biolarvicidas em escala industrial (SINGER, 1977; WEISER, 1984; WICKREMESINGHE; MENDIS, 1980). Lsp apresenta atividade larvicida para espécies dos gêneros *Culex*, *Anopheles*, *Aedes* e *Mansonia* (LACEY, 2007).

Lsp produz cristais durante a esporulação que possuem protoxinas inseticidas. Estas necessitam ser ingeridas pelas larvas dos mosquitos, processadas no seu intestino e, posteriormente, ligar-se a receptores específicos, desencadeando efeitos citopatológicos no epitélio do intestino e posteriormente a morte das larvas.

### 2.6.1 *Toxinas e modo de ação*

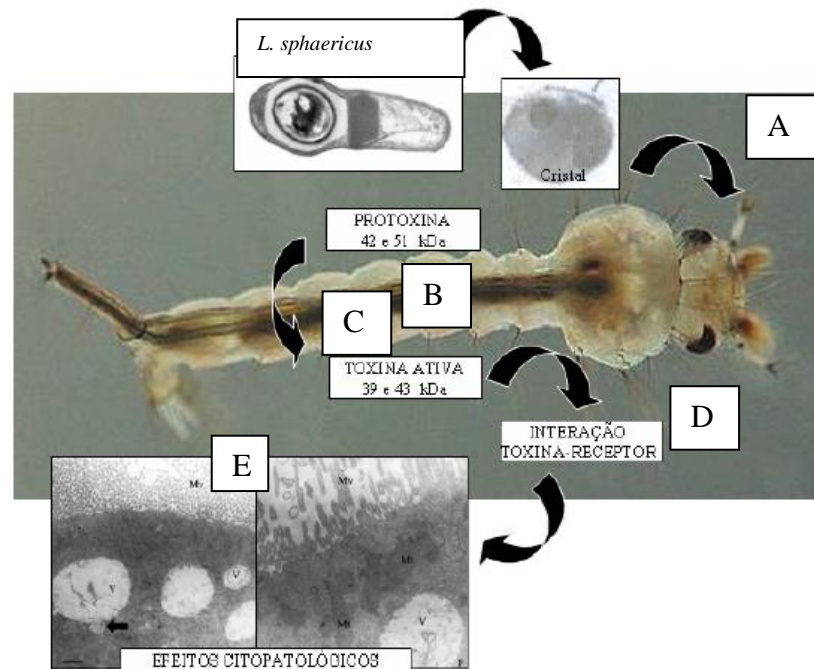
Quatro classes de toxinas inseticidas já foram identificadas em cepas de Lsp, a toxina binária (Bin), as toxinas mosquitocidas (Mtx); toxina binária Cry48Aa e Cry49Aa e sphaericolisinas (BERRY, 2012) (Figura 1). A toxina binária (Bin) é o principal componente inseticida encontrado em cepas de Lsp, e princípio ativo das cepas usadas na produção de biolarvicidas. A toxina Bin é produzida na forma de protoxina no interior dos cristais durante a esporulação, e possui atividade elevada e seletiva para alguns



gêneros de mosquitos como *Culex*, *Anopheles*, *Aedes* e *Mansonia* (LACEY, 2007). *Aedes aegypti* é considerado refratário para a toxina Bin, pois a concentração letal do Lsp para essa espécie é cerca de 100-1000 que àquela para *Culex pipens*, que é a espécie mais sensível (NIELSEN-LEROUX; CHALES, 1992). No entanto, a atividade para espécies do gênero é variável; *Aedes atropalpus*, por exemplo, apresenta uma suscetibilidade elevada, similar às espécies do complexo *C. pipens* (BERRY et al., 1993). Essa toxina é denominada Binária (Bin), pois é um heterodímero composto por dois polipeptídios, BinA (42 kDa) e BinB (51 kDa) que agem em sinergia e atingem a sua atividade larvicida máxima quando ambos os componentes estão presentes em concentrações equimolares (NICOLAS et al., 1993). Individualmente, as subunidades não possuem alta toxicidade.

O modo de ação da toxina Bin se inicia com a ingestão dos cristais tóxicos pelas larvas em ambiente aquático. Em pH alcalino intestinal das larvas, ocorre a solubilização dos cristais e a liberação das protoxinas Bin que no lúmen são clivadas por serina-proteases em fragmentos de menor peso molecular BinA (39 kDa) e BinB (43 kDa), que são considerados as toxinas ativas (BAUMANN et al., 1985, 1988; DAVIDSON et al., 1987) (Figura 1). Em seguida, os polipeptídeos ativos possuem a capacidade de serem tóxicas para as larvas (NIELSEN-LEROUX; CHALES, 1992). Estudos demonstraram que o componente BinB é responsável por reconhecer e se ligar a receptores específicos do epitélio intestinal das larvas, enquanto a BinA é responsável pela toxicidade para as células (NICOLAS et al., 1993; CHARLES et al., 1997). Sobre a ação da toxina Bin há outros avanços na sua caracterização, tais como a determinação de regiões e aminoácidos da sub-unidade BinB, responsáveis pela ligação aos receptores (ROMÃO et al., 2011; SINGKHAMANAN et al., 2013) além da estrutura cristalográfica (SRISUCHARITPAMIT et al., 2014). As interações de toxinas com receptores específicos das células do epitélio do intestino induzem a alterações citopatológicas que resultam na morte das larvas. Os principais efeitos citopatológicos da toxina Bin no epitélio intestinal de larvas são ruptura das microvilosidades, intumescimento das mitocôndrias, fragmentação do retículo, e intensa vacuolização citoplasmática (CHARLES, 1987; DE MELO et al., 2009; SILVA-FILHA; PEIXOTO, 2003). Um estudo a respeito do modo de ação celular da toxina mostrou que esta induz a autofagia nas células tratadas e é alvo de um processo de reciclagem em compartimentos específicos (OPOTA et al., 2011).

**Figura 1-** Modo de ação da toxina Binária presente nos cristais de *Lysinibacillus sphaericus* em larvas de *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: Romão (2010).

Nota: Após a ingestão (A), o cristal é solubilizado no pH alcalino intestinal, a protoxina Bin é liberada no lúmen do intestino (B) e processada até a forma de toxina ativa (C). Esta interage com receptores específicos (D) presentes na membrana apical do epitélio intestinal e desencadeia os efeitos patológicos (E), levando a larva a morte.

Mxt: As toxinas mosquitocidas são produzidas durante a fase vegetativa e classificadas como Mtx1, Mtx2, Mtx3 e Mtx4 (THANABALU et al., 1991; THANABALU; POTER, 1996). As Mxt são produzidas na fase vegetativa e, portanto, sofrem degradação por proteases presentes no meio de cultura (WATI et al., 1997; YANG et al., 2007). Por outro lado, quando a Mtx1 é expressa de forma recombinante e purificada na bactéria *Escherichia coli*, sua toxicidade é alta, mostrando-se equivalente à toxina Bin (THANABALU et al., 1992). Apesar das toxinas Mxt não terem um papel importante nas culturas esporuladas de cepas de Lsp, elas possuem potencial biotecnológico quando produzidas sob a forma recombinante.

Toxina binária Cry48/49: Esta é uma nova toxina binária produzida durante a esporulação de algumas cepas de Lsp como pequenas inclusões cristalinas, que foram

inicialmente identificadas na cepa de Lsp IAB59. Os componentes são as protoxinas Cry48Aa e Cry49Aa, com pesos moleculares de 135 e 53 KDa, respectivamente. A exemplo da Bin foi considerada uma nova toxina binária, pois é composta por dois polipeptídeos que atingem a toxicidade máxima quando ambos estão presentes em concentrações equimolares (JONES et al., 2007). O espectro de ação é limitado para larvas de *Culex* e os cristais-protoxinas também passam pelo processamento intestinal para a forma ativa (JONES et al., 2008). As toxinas parecem interagir com um sítio-alvo diferente daquele identificado para Bin, pois a toxina binária Cry48Aa Cry49Aa possui ação contra larvas resistentes a Lsp, que são desprovidas de receptores para a toxina Bin (DE MELO et al., 2008). Nas cepas nativas, estes cristais não são produzidos em quantidades elevadas, e em concentrações inferiores a toxina Bin. Portanto, esta toxina binária possui um potencial biotecnológico para seu desenvolvimento, mas ainda não é usada como princípio ativo de produtos.

### 2.6.2 Receptores da toxina Bin e resistência a Lsp

A toxina Bin é o principal fator inseticida das cepas de Lsp usadas para a produção de biolarvicidas. A sua ação, como discutido anteriormente, é altamente específica e dependente de sua ligação a receptores no epitélio intestinal das larvas. Os receptores da toxina Bin para *Culex pipens*, *C. quinquefasciatus* e *Anopheles gambiae* são  $\alpha$ -glicosidases (EC 3.2.1.20) ortólogas com cerca de 66-73 kDa, ligados a membrana epitelial das células do intestino através de uma âncora de glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (SILVA-FILHA et al., 1999). Essas proteínas foram denominadas em '*Culex pipens*, maltase 1 (Cpm1)', '*C. quinquefasciatus* maltase 1' (Cqm1) e '*An. gambiae* maltase 3' (Agm3). As sequências do cDNA de *cpm1* e *cqm1* estão depositadas no *GenBank* sob os números de acesso AF222024 e DQ333335 (DARBOUX et al., 2001; ROMÃO et al., 2006). Avaliando-se o grau de identidade entre esses receptores em nível da sequência proteica, observa-se que em relação a Cpm1 há 66% para *An. gambiae*, 74% para *A. aegypti* e 65% para *Drosophila melanogaster* (ROMÃO et al. 2006). Larvas de *A. aegypti* produzem a  $\alpha$ -glucosidases, Aam1, que é ortóloga com a Cpm1, no entanto, não tem capacidade de interação com a toxina Bin (FERREIRA et al., 2010; 2014).

Lsp apresenta modo de ação baseado na interação entre a toxina Bin a uma única classe de receptores, e esta condição é favorável para seleção da resistência, comparada

ao Bti, que possui complexo modo de ação (FERREIRA; SILVA-FILHA 2013). A detecção da resistência de *C. pipiens*/ *C. quinquefasciatus* a Lsp já foi registrada em colônias selecionadas em laboratório (AMORIM et al., 2007; PEI et al., 2002; WIRTH et al., 2000a), assim como em populações naturais de campo expostas a tratamentos (MULLA et al., 2003; NIELSEN-LEROUX et al., 1995, 1997, 2002; RAO et al., 1995; YUAN et al., 2000). Neste modelo, o mecanismo mais comum de resistência é a ausência de receptores funcionais no epitélio intestinal devido a mutações no gene *cqm1* e *cpm1* (CHALEGRE et al., 2012; DARBOUX et al., 2002; 2007; GUO et al., 2013; NIELSEN-LEROUX et al., 1995; 2002; OLIVEIRA et al., 2004; ROMÃO et al., 2006). Entretanto, existem duas populações de *C. pipiens* (SPHAE e TUNIS) resistentes a Lsp, que apresentam receptores Cqm1 funcionais, sugerindo a existência de outros mecanismos de resistência que ainda não foram elucidados (NIELSEN-LEROUX et al., 1997, 2002).

As mutações no gene *cqm1* podem gerar transcritos que codificam proteínas truncadas sem âncora GPI e por não estarem localizadas no epitélio, não conseguem se ligar à toxina Bin, ocasionando a refratariedade (Quadro 1). Até o presente momento, oito alelos de *cpm1/cqm1* de genes associados à toxina Bin foram descritos, sete deles se caracterizam por deleções ou mutações *nonsense*, que criam um códon de parada prematuro e respectivos transcritos codificam proteínas truncadas sem âncora GPI. Existe uma exceção no caso da colônia BP da França, ocorrem dois eventos no gene *cpm1* que levam à resistência a Lsp em larvas de *C. pipiens*. Em um deles, o alelo denominado *cpm1BP-del*, foi originado por uma inserção de um elemento transponível ou transposon no éxon 2. Esta inserção leva a um evento no processamento do RNA mensageiro, e uma deleção de 198 pb ocorre no mesmo éxon. Esta deleção não muda a fase de leitura, entretanto, por razões ainda desconhecidas, a proteína codificada por este alelo (desprovida de 60 ou 66 aminoácidos) é incapaz de se ligar à toxina Bin. Uma das possibilidades é que a perda desses aminoácidos afete o sítio de ligação do receptor ou cause mudanças na conformação da molécula (DARBOUX et al., 2007).

**Quadro 1-** Alelos de resistência do gene *cqm1/cpm1* do complexo *Culex pipens* associados a resistência à toxina Bin de *Lysinibacillus sphaericus*.

Alelo	País	Origem	Mutação	Referência
<i>cqm1 geo</i>	EUA	Laboratório	T1706A	Darboux et al., 2002
<i>cpm1BP</i>	França	Campo	Gln396stop	Darboux et al., 2007
<i>cpm1BP-del</i>	França	Campo	Deleção 198nt	Darboux et al., 2007
<i>cqm1R</i>	China	Laboratório	Deleção de C (445)	Guo et al., 2013
<i>cqm1REC</i>	Brasil	Laboratório	Deleção 19 nt (1257-1275)	Romão et al., 2006
<i>cqm1REC2</i>	Brasil	Laboratório	G1292A	Chalegre et al., 2015
<i>cqm1 REC-D16</i>	Brasil	Campo	Deleção 16 nt (1306-1321)	Chalegre et al., 2012
<i>cqm1 REC-D25</i>	Brasil	Campo	Deleção 25 nt (1276-1300)	Chalegre et al., 2012

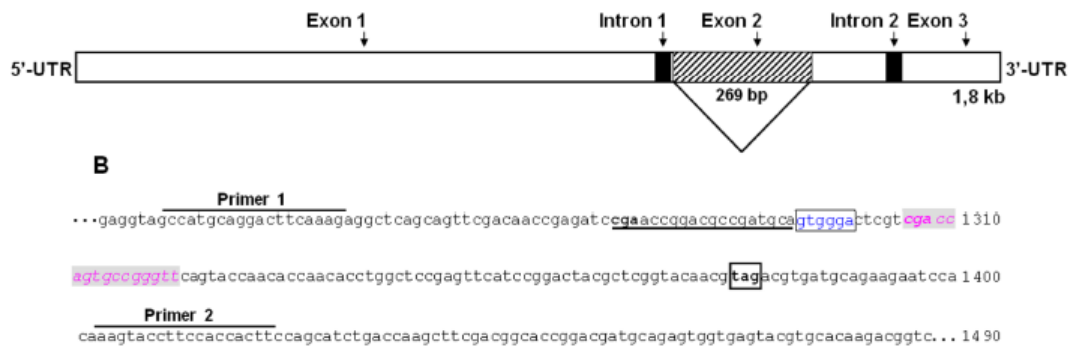
Fonte: a autora.

Dentre os oito alelos identificados, quatro foram caracterizados em amostras de populações de *C. quinquefasciatus* de bairros do Recife. O primeiro alelo identificado foi obtido de uma colônia de *C. quinquefasciatus* resistente a Lsp (R2362), o alelo *cqm1REC* possui uma deleção de 19 nucleotídeos na posição 1225-1243, que causa uma mudança na fase de leitura e origina um códon de terminação da tradução prematuro (ROMÃO et al., 2006). A proteína truncada de 452 aminoácidos, que seria codificada pelo alelo *cqm1REC*, não é expressa, de forma equivalente à proteína selvagem de acordo com uma análise de padrão de transcrição (CHALEGRE et al., 2015). Após a identificação do alelo *cqm1REC* na colônia R2362, um *screening* do alelo em larvas de populações de *C. quinquefasciatus* de áreas da cidade do Recife (Brasil) não tratadas com Lsp, detectou a sua presença em frequências que variaram de 0,001 a 0,006. Durante os estudos de detecção de alelo *cqm1REC*, em populações do Recife novos polimorfismos do gene *cqm1* com deleções de 16 (1306 to 1321 nt) e 25 (1276 to 1300 nt) foram encontradas na mesma região gênica onde está localizada a

deleção de 19-nt (*cqm1<sub>REC</sub>*, *cqm1<sub>REC-D16</sub>*, *cqm1<sub>REC-D25</sub>*), (CHALEGRE et al., 2012) (Figura 2) (Quadro 2).

Recentemente mais um alelo do gene *cqm1*, denominado *cqm1<sub>REC-2</sub>* foi identificado na colônia R2362, que vem sendo mantida sob uma pressão de exposição a Lsp há vários anos. Esse alelo se caracteriza por uma mutação *nonsense* G1324A gerando um *stop* códon prematuro (Trp431Stop). O resultado da codificação do transcrito é um polipeptídeo truncado sem âncora GPI (CHALEGRE et al., 2015), a exemplo de outros três alelos descritos acima.

**Figura 2** - Representação do gene que codifica o receptor Cqm1 em *Culex quinquefasciatus* (número de acesso no GenBank DQ333335) e localização dos polimorfismos dos alelos *cqm1<sub>REC</sub>*, *cqm1<sub>REC-D16</sub>* e *cqm1<sub>REC-D25</sub>*.



Fonte: Chalegre et al. (2012).

Nota: **A.** sequência de 1848 nucleotídeos (nt) contendo dois íntrons de 50- (1169-1218) e 55-nt (1655-1709). **B.** Região de 269 nt (1221-1490) que engloba os polimorfismos dos alelos encontrados nas populações de Recife, os quais são: deleção de 19 nt correspondendo ao alelo *cqm1<sub>REC</sub>* (sublinhada); as seis bases adicionais correspondentes ao *cqm1<sub>REC-D25</sub>* (azul e enquadradas); a deleção de 16 nt do alelo *cqm1<sub>REC-D16</sub>*, localizada 11 bases além da deleção de 19 nt, (itálico, rosa e sombreado). O códon de terminação prematuro da tradução originado pelas deleções está enquadramento e em negrito. Para a PCR alelo-específica, os primers 1 e 2 foram utilizados para as regiões 5' e 3', respectivamente.

**Quadro 2-** Frequência de alelos do gene *cqm1* em populações de *Culex quinquefasciatus* determinados por PCR. Nd - não determinado.

Amostra	<i>cqm1</i> <sub>REC-D19</sub>	<i>cqm1</i> <sub>REC-D16</sub>	<i>cqm1</i> <sub>REC-D25</sub>	<i>cqm1</i> <sub>REC2</sub>	Referências
Fazenda Nova	0,003	Nd	Nd	Nd	Chalegre et al., 2009
Peixinhos	0,006	Nd	Nd	Nd	Chalegre et al., 2009
Ipojuca	0,002-0,003	0	0	0	Chalegre et al., 2012; Menezes et al.,2016
Jaboatão	0,001-0,003	0,003	0	0,002	Chalegre et al., 2012; Menezes et al.,2016
Roda de Fogo	0,004-0,0017	0	0	0	Chalegre et al., 2012; Menezes et al.,2016
Azeitona	0,002-0,004	0,006	0	0	Chalegre et al., 2012; Menezes et al.,2016
Água Fria	0,033-0,050 0,006-0,055	0	0,002	0	Chalegre et al.,2009; 2012; Menezes et al., 2016

Fonte: Chalegre et al. (2009, 2012); Menezes et al. (2016).

## 2.7 *Bacillus thuringiensis* (serv.) *israelensis* (Bti)

É uma bactéria Gram-positiva entomopatogena, inicialmente isolada em 1976 em larvas mortas de *C. pipens*, bactéria cosmopolita, podendo ser encontrada em solo e habitat aquáticos (GOLDBERG; MARGALIT 1977). Bti apresenta atividade larvicida para vários gêneros da ordem Diptera, tais como: *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Simulium*, além de chironomídeos (GOLDBERG; MARGALIT 1977; LACEY 2007). A exemplo de Lsp, a ação larvicida de Bti, também se deve à presença dos cristais produzidos durante a esporulação. O cristal contém toxinas da família Cry, que possuem domínios e agem especificamente em receptores, bem como toxinas da família Cyt que possuem ação citolítica (BEN-DOV, 2014; LACEY, 2007; SOBERÓN et al., 2007). Bti foi o primeiro biolarvicida bacteriano introduzido no controle de dípteros, em 1982, no escopo do

programa de controle de oncocercose na África Ocidental (GUILLET et al., 1990). Desde então, vários estudos constataam a eficiência do modo de ação do Bti no controle de mosquitos (GOLDBERG e MARGALIT, 1977, LACEY, 2007, 2015; REGIS et al., 2001).

### 2.7.1 Toxinas e modo de ação

Bti apresenta um modo de ação cujas etapas iniciais são semelhantes àquelas descritas anteriormente para Lsp. Após ingestão e solubilização dos cristais em meio alcalino no intestino das larvas, ocorre a ativação proteolítica das protoxinas em toxinas, ligação de toxinas ativas do epitélio intestinal e subsequente formação de poros na membrana das células resultando na lise celular (BRAVO et al., 2007; KNOWLES; ELLAR, 1987).

As protoxinas mais comumente encontradas nos cristais de Bti são Cry4Aa (125 kDa), Cry4Ba (135 kDa) Cry11Aa (68 kDa) e a CytAa (28 kDa). Algumas cepas de Bti podem apresentar cristais contendo as toxinas Cry10Aa e Cyt2Ba que também apresentam atividade larvicida contra mosquitos (BERRY et al., 2002; GUERCHICOFF, UGALDE; RUBINSTEIN, 1997; THORNE et al., 1986). Abaixo, algumas características das toxinas:

- a) Cry:** Possuem três domínios estruturais com as seguintes funções: domínio I formado por  $\alpha$ -hélices é a porção da toxina responsável pela inserção na membrana das células intestinais, que resulta na oligomerização, formação de poros, e perda de balanço osmótico celular, que leva à lise celular (BOONSERM et al., 2006). Os domínios II e III são formados, sobretudo, por alças e folhas  $\beta$  e são responsáveis pela interação específica com os receptores nas células intestinais (DE MAAG et al., 2003; PIGOTT; ELLAR, 2007).
- b) Cyt:** Possuem um único domínio constituído por  $\alpha$ -hélices e folhas beta, e são toxinas com ação citolítica, agindo diretamente na membrana da célula formando poros, ou através de uma ação detergente (BUTKO, 2003; BRAVO; GIL; SOBERÓN, 2007; KONI; ELLAR, 1994). As toxinas de Bti atuam em sinergia, ou seja, as toxinas individualmente possuem baixa atividade, mas quando todas estão presentes, a atividade é elevada (CRICKMORE et al., 1995). A sinergia é promovida pela toxina Cyt1Aa que tem capacidade de ligarem-se as toxinas Cry, induzir a formação de oligômeros que por sua vez se ligam aos receptores de epitélio com alta afinidade (CANTÓN et al., 2011; PÉREZ et al., 2005, 2007).



### 2.7.2 Receptores e potencial de resistência

Alguns grupos de moléculas como caderinas (CADs), N-aminopeptidases (APNs), fostatases alcalinas (ALPs), glicoconjugados e algumas metaloproteases podem atuar como receptores de toxinas Cry no epitélio (ADANG, 2004; JURAT-FUENTES; OCHOA-CAMPUZANO et al., 2007; KNIGHT; CRICKMORE; ELLAR, 1994; VADLAMUDI et al., 1994; VALAITIS et al., 2001). Estudos demonstram que as CADs funcionam como receptores das toxinas na Cry11Aa e Cry4Ba em *A. aegypti* e *A. gambiae* (CHEN et al., 2009a; HUA et al., 2008). Alguns autores constataram a atividade das ALPs e APNs e  $\alpha$ -amilases como receptores das toxinas Cry11Aa e Cry4Ba em intestino de larvas de *A. aegypti* (CHEN et al., 2009; DECHKLAR et al., 2011; FERNANDEZ et al., 2005; FERNANDEZ-LUNA et al., 2010; SAENGWIMAN et al., 2011). Como descrito acima, a Cyt1Aa também pode servir como receptor de toxina Cry11Aa e Cry4Ba, promovendo a oligomerização necessária para ligação de outros receptores do epitélio e subsequente formação de poros característica dessa toxina (CANTON et al., 2011; PEREZ et al., 2005). Essa atuação da Cyt1Aa como receptor de outras toxinas é uma grande vantagem, pois reduz as possibilidades de seleção de resistência para Bti.

A resistência a Bti em populações de mosquito de campo tem sido intensamente investigada há mais de 35 anos, no entanto, sem ainda ter sido detectada nesses insetos (BECKER; LUDWIG, 1993; KAMGANG et al., 2011; TETREAU et al., 2012). Dados referentes a avaliações de mais de 50 populações de *C. pipiens* sem histórico do uso de Bti, mostraram razões de resistência (RR) com valores entre 3,0 a 12,5 vezes (VAZQUEZ et al., 2009; WIRTH; FERRARI; GEORGHIOU, 2001). Em populações tratadas de *A. aegypti*, *A. albopictus* e *A. rusticus*, essas razões de resistência variaram em intervalos menores entre (1- 3,9) (AZIZ et al., 2011; BOYER et al., 2012; KAMGANG et al., 2011).

Em laboratório, estudos de resistência para toxinas isoladas de Bti foram realizados, e demonstraram que larvas de *A. aegypti* expostas às toxinas Cry4Aa, Cry4Ba e Cry11Aa individualmente, foram alcançadas RRs (razões de resistência) de 68, 9 e 9 vezes respectivamente (TETREAU et al., 2012). O modo de ação complexo baseado na ação de quatro toxinas com diferentes receptores não favorece a seleção da resistência, exceto quando as toxinas são utilizadas individualmente, o que não ocorre quando

biolarvicidas contendo os cristais do Bti são usados. Estudos demonstram que essa sinergia entre toxinas existentes no Bti pode acontecer também com toxinas de outra espécie de bactéria como o Lsp (THIERRY et al., 1998; WIRTH et al., 2000b), como será descrito no item 2.9.

## 2.8 Utilização de Lsp e Bti em campo

Bactérias entomopatógenas vêm sendo utilizadas para controle de mosquitos em várias partes do mundo. Em alguns países, como Brasil, Índia, Camarões, Sri Lanka e Tanzânia constatou-se o impacto da utilização de Lsp no controle do vetor da filariose linfática, reduzindo a densidade populacional de mosquitos e conseqüentemente a exposição dos humanos às larvas filariais infectivas (BECKER, 2000; REGIS et al., 2000). No Brasil, a utilização de Lsp em campo para o controle de *C. quinquefasciatus* aconteceu inicialmente no Distrito Federal (Brasília), seguido de outros programas em Belo Horizonte e Recife, quando reduções significativas da densidade de *C. quinquefasciatus* foram alcançadas (CONSOLI et al., 1997). Em Recife, no bairro do Coque, aconteceu uma importante experiência de uso, em campo, de Lsp, que é uma área historicamente endêmica para a filariose linfática, em um período em que a prevalência média da infecção era de 10% da população humana. A área foi submetida a intervenções de controle de *C. quinquefasciatus*, e o tratamento de mais de 3.000 criadouros com Lsp durante 27 meses, em uma área de 1,2 km<sup>2</sup>, foi a ação prioritária das intervenções. Esta intervenção resultou em uma redução da densidade de larvas e pupas de *C. quinquefasciatus* de 437,8 larvas e pupas/amostra, antes do início do tratamento, para valores entre 0,02 e 30 larvas/amostra (REGIS et al., 1995). Outra constatação desse estudo foi a menor suscetibilidade a Lsp (CL<sub>50</sub> dez vezes maior), detectada na população de *Culex* do bairro do Coque após 26 meses do início do tratamento (SILVA-FILHA et al., 1995). Segundo Regis et al. (1996), é necessário manter o monitoramento da suscetibilidade das populações de *C. quinquefasciatus* submetidas a exposição prolongada a Lsp, ao mesmo tempo que indicam a viabilidade de alternar o uso dessa bactéria com o Bti. Outro bairro do Recife que utiliza Lsp no controle de *C. quinquefasciatus* é Água Fria, sua utilização acontece há mais de dez anos, o que naturalmente aumenta a possibilidade de seleção de indivíduos resistentes (SILVA-FILHA et al., 2008). Alguns trabalhos já demonstram também a eficiência do Lsp no controle vetorial de anofelinos (LACEY, 2007). Estudos de Rodrigues et al. (1998)

constatarem a atividade desse larvicida à base de Lsp para *Anopheles nuneztovari* e *Anopheles darlingi*. Outro estudo também reportou um controle do vetor da malária *Anopheles simensis* em Hubei, uma província da China utilizando Lsp e Bti (XU et al., 1992; YUAM et al., 2000).

A utilização de Bti ocorreu logo após seu descobrimento, após o isolamento da cepa H-14 em Israel em 1977, suas propriedades larvidas para dípteros foram caracterizadas (DE BARJAC, 1978; GOLDBERG; MARGALIT, 1977). Larvicidas à base de Bti apresenta atuação satisfatória em campo, levando à redução da densidade larval em diferentes tipos de criadouros de simulídeos, culicídeos e chironomídeos (GOLDBERG; MARGALIT, 1978; REGIS et al., 2001; LACEY, 2007). O marco histórico de sua utilização foi o programa de controle da Oncocercose na década de 80, na África Ocidental (GUILLET et al., 1990). Outro exemplo de sua eficiência em campo é o programa de controle de *Aedes vexans* no vale do rio Reno na Alemanha, que utiliza Bti há mais de 30 anos (BECKER, 1997). No Brasil, esse biolarvicida também tem sido empregado desde 1982 no controle de simulídeos na Serra Gaúcha no Rio Grande do Sul (MARDINI et al., 2000). Atualmente está sendo utilizado por alguns municípios da Região Metropolitana do Recife no tratamento de criadouros de *A. aegypti*.

Existem vantagens e desvantagens na utilização desses larvicidas. Lsp possui persistência de sua ação em áreas ricas em matéria orgânica, além do seu alto potencial de reciclagem em ambientes poluídos, que é superior ao Bti (LACEY et al., 1988; LACEY, 2007). No Brasil o uso do Lsp é fortemente recomendado, entretanto, populações de *C. quinquefasciatus* podem se tornar resistentes com seu uso continuado, além da ausência de atividade tóxica significativa para *A. aegypti* (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992). Já os biolarvicidas à base de Bti apresentam uma maior sensibilidade a radiação solar do que Lsp e ambientes aquáticos com alta carga de matéria orgânica, o que dificulta a persistência desse larvicida em alguns tipos de criadouros, característicos de regiões tropicais como o Brasil (LACEY 2007). Entretanto, o sucesso na atividade tóxica de Bti é garantido pela presença de diferentes toxinas que agem sinergicamente para a completa expressão de sua toxicidade, através de ligações com múltiplos receptores, dificultando assim, o processo de seleção de resistência nas populações de mosquitos expostas (ARAUJO et al., 2013; FERREIRA; SILVA-FILHA, 2013; GEORGHIOU; WIRTH, 1997; LIKITVIVATANAVONG et al., 2011; SOBERON et al., 2007). Embora essa bactéria seja utilizada no controle de larvas, Stoops (2005) mostrou que Bti pode atuar também como

um estimulante a postura, pois fêmeas de *Aedes albopictus* deixam mais ovos em recipientes tratados com Bti comparado aos não tratados.

Assim, a escolha pelo biolarvicida deve se basear nas características ambientais e mosquitogênicas dos criadouros a serem tratados. Atualmente, existem no mercado produtos à base de Lsp e Bti, porém com custo mais elevado comparado a outros larvicidas químicos. Esse fato muitas vezes limita a escolha do uso e disponibilização federal desse tipo de larvicidas pelos municípios. Desta forma, o número de municípios que aderem ao uso de biolarvicidas para controle vetorial de mosquitos ainda é reduzido, apesar de todas as vantagens ambientais comprovadas.

## 2.9 Sinergias entre Lsp e Bti e perspectivas do seu uso combinado

Em razão das características descritas dos biolarvicidas, estudos prévios vêm demonstrando que Bti pode ser um importante aliado para prevenir o surgimento de resistência a Lsp. Bti possui ação sinérgica de múltiplas toxinas, como descrito anteriormente, em alvos distintos daqueles da toxina Bin (FILLINGER; LINDSAY, 2006). Além disso, Bti não possui resistência cruzada com Lsp, visto que estudos demonstraram que larvas resistentes à toxina Bin são suscetíveis a toxicidade de Bti (AMORIM et al., 2007; NIELSON-LEROUX et al., 1995; PEI et al., 2002). A sinergia entre a toxina Bin e Bti já foi evidenciada na literatura, Thierry et al. (1998), descreveram o efeito sinérgico entre Cyt1Ab e a toxina Bin, demonstrando que a associação entre Lsp e Bti possui uma significativa atividade tóxica contra colônias resistentes à Bin. Estudos semelhantes foram desenvolvidos por Wirth et al. (2000a), que demonstraram que a combinação Cyt1A e Lsp apresenta toxicidade para larvas de *C. quinquefasciatus* de linhagens resistente a Lsp. Além disso, foi constatado que a Cyt1A também age em sinergia com a toxina Bin contra *A. aegypti*, que naturalmente é considerado insensível a Bin (WIRTH et al., 2000b). Outra linha de pesquisa tem direcionado estudos para o desenvolvimento de bactérias recombinantes capazes de produzir simultaneamente as toxinas de Lsp e Bti, mas ainda não foram testados em campo, sendo uma perspectiva promissora para o desenvolvimento de novos produtos (FEDERICI et al., 2007; PARK et al., 2005; FEDERICI; PARK; BIDESHI, 2010). Na ausência de organismos recombinantes é possível usar cristais nativos de cada uma delas, em um sistema de rotação ou conjugação ou dessas bactérias.

Pelas razões acima descritas, a associação de cristais Lsp e Bti é considerada promissora e tem motivado o desenvolvimento de produtos conjugados contendo cristais das duas bactérias (CETIN et al., 2007; ZAHIRI et al., 2002). Um deles é o produto comercial (VectoMax® WSP) constituído de cristais de Lsp (2.7%) e Bti (4.5%). O uso combinado de Lsp/Bti nesse produto pode ser útil para agregar as vantagens dos agentes nos seguintes aspectos: ampliar o espectro de ação para as espécies alvo, reduzir o potencial da resistência associado ao uso isolado da toxina Bin. Estudos realizados por Anderson et al. (2011) em caixas de inspeção em Stratford - EUA, utilizando esse produto observaram uma redução significativa no número de larvas e pupas de *C. pipens* e *Aedes japonicus* após a segunda aplicação do larvicida comparado ao controle (sem aplicação de larvicida). Dritz et al. (2011) obtiveram uma redução significativa da densidade de larvas e pupas de *Culex tarsalis* e *Aedes malanimon* em regiões alagadas (“wetlands”) da Califórnia-USA. Recentemente, Cetim et al. (2015), avaliando a eficácia do VectoMax® WSP em fossas sépticas, constataram que a utilização de 10 ou 20 g por criadouro tipo tanque resulta no controle de 96% das larvas de *Culex* sp. por 24 dias. Assim, essa mistura de toxinas resultou em um produto que pode ser utilizado para o controle de várias espécies de mosquitos.

No contexto de áreas urbanas do Recife, onde duas espécies (*C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*) são bem adaptadas e proliferam em abundância, a substituição de dois larvicidas por um único produto conjugando que possui as duas bactérias (VectoMax® WSP) pode apresentar vantagens operacionais e aumentar a eficiência de controle das duas espécies-alvo. Neste estudo foi feita uma avaliação da eficácia deste produto em uma área endêmica para FL e importantes arboviroses, onde são abundantes criadouros de *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*.

### 3 JUSTIFICATIVA

O controle de insetos vetores de agentes etiológicos de doenças humanas é uma intervenção importante para interromper o ciclo dessas enfermidades. Além disso, a redução na densidade populacional de vetores contribui para a melhoria da qualidade da saúde e de vida das pessoas e do ambiente. O uso de larvicidas seletivos contribui para a sustentabilidade dos programas de controle de insetos vetores. Biolarvicidas à base de bactérias entomopatogênicas como *Lysinibacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis* svar *israelensis* têm importância fundamental, pois apresenta alta eficiência como larvicida. Além disso, estão sendo atualmente utilizadas nos Programas de Controle de *C. quinquefasciatus*, no Plano Nacional de Eliminação da Filariose Linfática (PNEFL), e no controle de *A. aegypti*, no Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), respectivamente, conduzidos na Região Metropolitana do Recife.

Na cidade do Recife as duas espécies de mosquitos coabitam e são importantes vetores. Estratégias e produtos que sejam eficazes no controle populacional e retardem o surgimento de populações de mosquitos resistentes aos agentes inseticidas empregados são necessários para assegurar o objetivo dos programas de controle. O presente estudo visa ao aperfeiçoamento do uso de dois biolarvicidas através da avaliação do produto vectomax, não comercializado no Brasil, constituído à base de Lsp e Bti, apresentando propriedades tóxicas para *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*, concomitantemente.

#### 4 PERGUNTA CONDUTORA

O produto VectoMax® CG é um biolarvicida eficaz para o controle da densidade populacional de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* e seu uso desfavorecendo a seleção de alelos de resistência *C. quinquefasciatus* a Lsp?

## 5 HIPÓTESE

- a) O biolarvicida VectoMax<sup>®</sup> CG é capaz de eliminar as formas larvais de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* causando uma redução da densidade populacional dessas espécies.
- b) O VectoMax<sup>®</sup> CG por possuir múltiplas toxinas e é capaz de eliminar larvas portadoras de alelos de resistências ao Lsp e, portanto, desfavorecendo a seleção de resistência na população de *Culex quinquefasciatus*.



## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Geral

Avaliar o impacto de um biolarvicida conjugado à base de *Lysinibacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis ser. israelensis* na redução populacional de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* e suas vantagens para o controle de vetores.

### 6.2 Específicos

- a) Avaliar a densidade populacional de *C. quinquefasciatus* e de *A. aegypti* nas áreas tratada com VectoMax® WSP e naquela tratada com produtos à base de Lsp e Bti separadamente.
- b) Investigar e monitorar a presença de *A. aegypti* em criadouros, preferencialmente, colonizados por *C. quinquefasciatus*.
- c) Avaliar a suscetibilidade de larvas de *C. quinquefasciatus* das populações a Lsp;
- d) Determinar a frequência dos alelos de resistência do gene *cqm1* a Lsp nas populações de *C. quinquefasciatus* avaliadas.

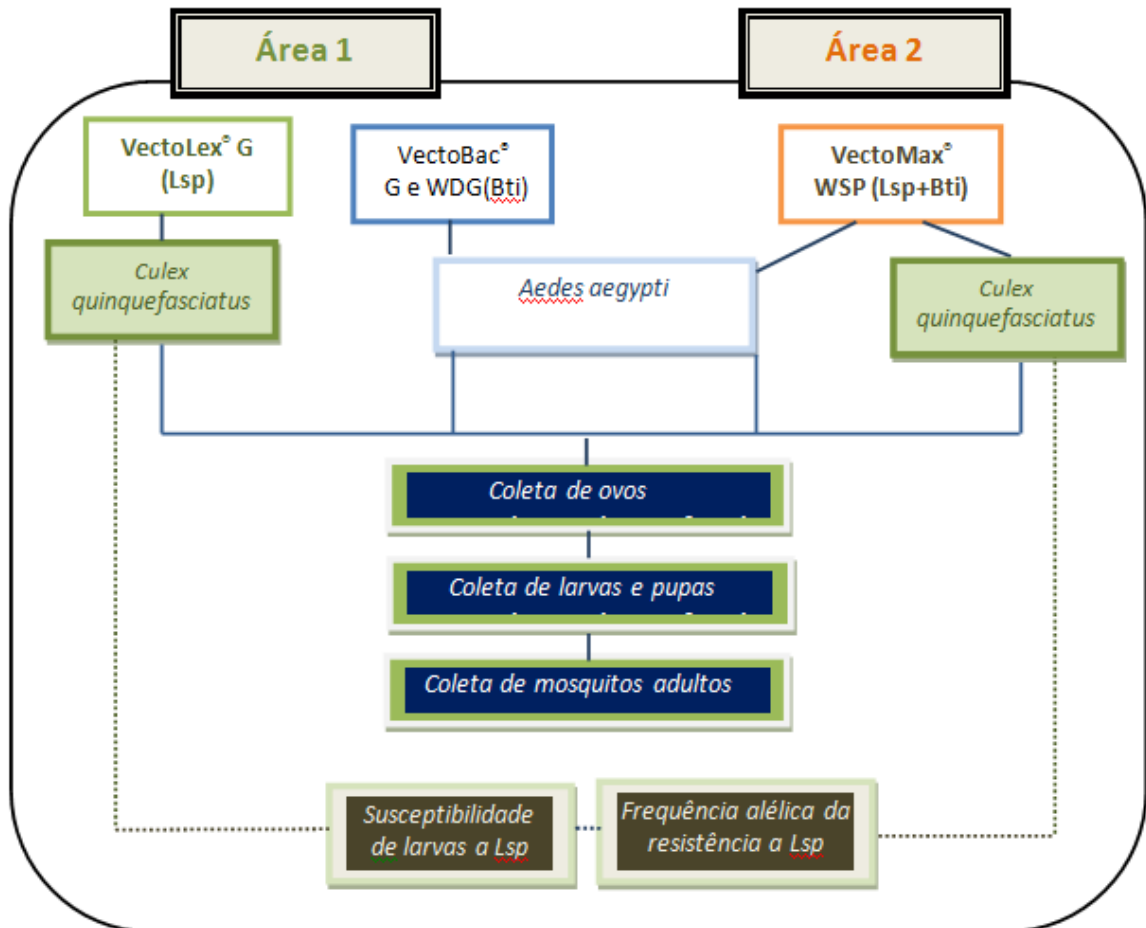
#### 6.2.1 Objetivo secundário

- a) Investigar e monitorar a presença de *A. aegypti* em criadouros, preferencialmente, colonizados por *C. quinquefasciatus*.

## 7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Uma sinopse das abordagens realizada para avaliação dos tratamentos com biolarvicidas para *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* está exposta no esquema (Figura 3).

**Figura 3-** Esquema metodológico.



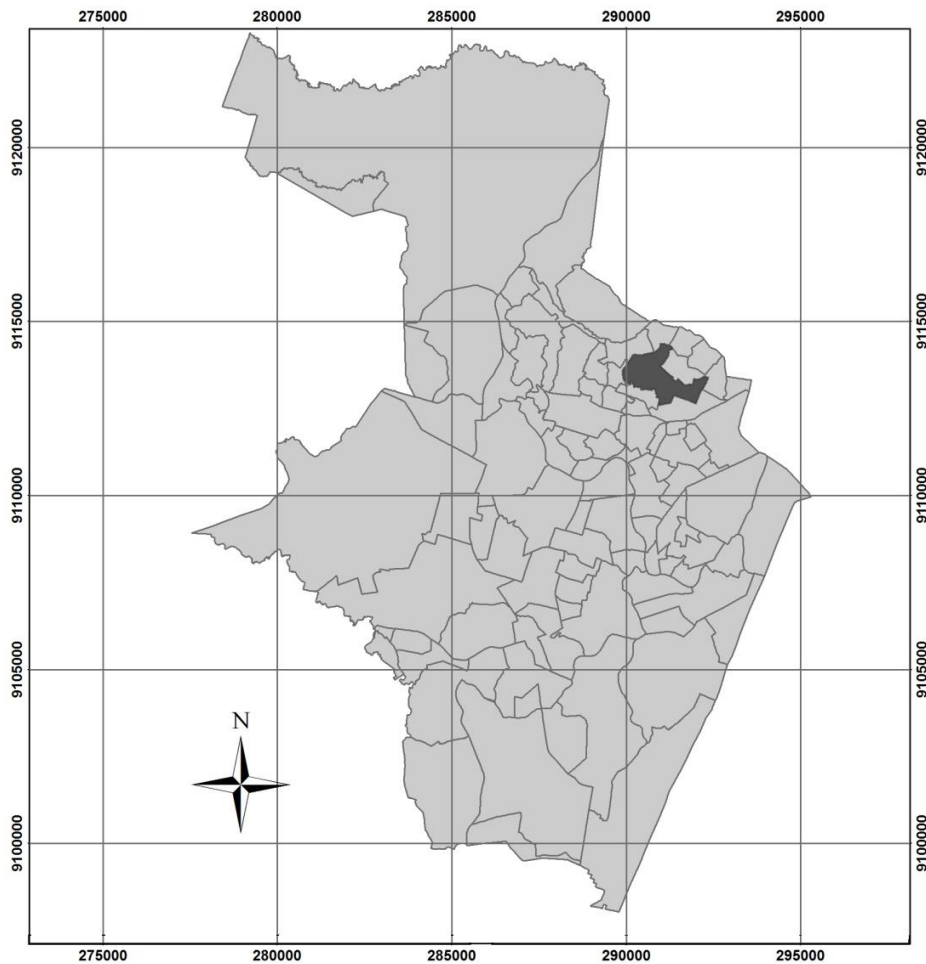
Fonte: A autora.

### 7.1 Áreas de estudo

As avaliações foram realizadas em Água Fria, um dos 94 bairros da cidade do Recife (08° 00.843'S; 034° 54.164'W) (Figura 4). Recife possui uma média de temperatura anual de 27°C, variando entre 21°C a 32°C; umidade relativa entre 70 - 90%, e precipitação média anual de 2200 mm, baseado nos dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Essas condições climáticas favorecem a proliferação dos mosquitos durante o ano. Água Fria não possui sistema de esgoto, ao invés disso, existem, canais abertos, fossas e caixas de passagem

e valetas. O abastecimento de água é intermitente, levando a população a fazer armazenamento de água dentro das casas. Água Fria ocupa uma área de 181,9 ha, com 44.000 habitantes residindo em cerca de 8500 casas. Este bairro é caracterizado pelo tamanho reduzido de suas habitações e alta densidade, geralmente sem quintal. O estudo foi realizado em uma área que corresponde a cerca 12% do bairro, totalizando 1.046 casas (~3600 habitantes). Neste bairro, medidas de controle vetorial são realizadas desde 2002, seguindo as ações do PNEFL e do PNCD, que incluem intervenções ambientais e aplicação bimensal dos larvicidas Lsp e Bti em criadouros de *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*, respectivamente.

**Figura 4** - Localização da área de estudo, cidade do Recife, em destaque o bairro de Água Fria.



Fonte: A autora.

## 7.2 Desenho experimental (Intervenção)

O impacto do produto larvicida composto pela mistura de cristais tóxicos de Lsp e Bti, foi avaliado durante o período de três anos (maio 2010 a abril 2013). Para esta proposta, Água Fria foi dividido em duas áreas: A1 com 583 casas (~2040 habitantes) e A2 com 463 casas (~1620 habitantes) (Figura 4 e 5). Essas áreas apresentam características similares, como baixa renda, saneamento precário, grande número de criadouros, habitações desordenadas, além de semelhantes características mosquitogênicas, como descrito no item 7.1.

Foram utilizados quatro biolarvicidas apresentados sob forma de grânulos, produzidos pela Sumitomo Chemicals (Valent BioSciences). As características desses produtos estão descritos no quadro 3.

**Figura 5-** Áreas de estudo no bairro de Água Fria, (Recife), onde os criadouros da A1 foram tratados com Vectobac® G (Bti) e na A2 com o conjugado Vectolex® G (Lsp) na VectoMax® CG (Lsp+Bti) na área 2.



Fonte: A autora.

Nota: Em cada área foram feitas coletas de adultos por aspiração (15 casas), coletas de ovos por ovitrampas (30 casas) e coletas de jangadas/larvas/pupas por “conchadas” (5 - 10 fossas).

### 7.2.1 Operacionalidade

Os produtos larvicidas foram disponibilizados, pela empresa Sumitomo, ao Distrito Sanitário II de Recife para o tratamento dos criadouros de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*. Inicialmente uma vasta descrição dos criadouros foi realizada nas áreas de estudo, ciclos bimensais de tratamento foram realizados. O critério de tratamentos dos criadouros foi estabelecido pelo serviço, em que todos os criadouros positivos foram tratados e além daqueles que apresentassem maiores riscos de se tornarem reais criadouros, levando em consideração a extensão, a profundidade e a impossibilidade de eliminação. As aplicações foram realizadas pelos agentes de saúde ambiental de acordo com sua dinâmica de trabalho. Uma adaptação da quantidade produto utilizado a ser aplicada foi necessária. Pois de acordo com o rótulo do produto sua dosagem deveria ser realizada de acordo com o volume ( $m^3$ ) da superfície a se tratada. Os tipos de criadouros existentes no bairro são distintos, como fossas, canais, canaletas, além de pequenos recipientes de acúmulo de água. Dessa forma, a dosagem utilizada foi calculada de acordo com a extensão ( $m^2$ ) dos criadouros. Dezoito ciclos de tratamento foram realizados durante o estudo; destes, 12 deles foram monitorados quanto à quantidade de produto utilizado, número, dimensões de criadouros tratados e eliminados.

Na A1, os criadouros continuaram sendo tratados com os biolarvicidas preconizados pelo PENFL e PNCD. O produto VectoLex<sup>®</sup>G (Lsp) (7,25 g  $m^2$ ) e VectoBac<sup>®</sup>G (Bti) (1 g/ $m^2$ ) foram utilizados nos criadouros de *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* respectivamente. O VectoBac<sup>®</sup> WDG (Bti) (37,4% IA, Valent BioScience a 1 g/ $m^2$ ) foi aplicado naqueles criadouros com água potável para consumo humano.

Na A2, o produto VectoMax<sup>®</sup> CG (5,5 g/ $m^2$ ) foi usado em todos os criadouros colonizados por *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*. Assim como na área 1, apenas, em reservatórios contendo água para consumo humano foi mantido o uso do VectoBac<sup>®</sup> WDG (Bti) a 1g/ $m^2$ .

**Quadro 3** - Produtos à base de *Lysinibacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis ser. israelensis*, apresentado sob a forma de grânulos utilizados para controle de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, em duas áreas de estudo, no bairro de Água Fria, Recife-PE.

Produto	Princípio ativo (%)	Dose usada	Cepa	Uso (Criadouros)	UTI/mg
<b>Vectobac® G</b>	Bti (2,8)	1 g/m <sup>2</sup>	AM65-52	<i>A. aegypti</i>	200
<b>Vectolex® G</b>	Lsp (7,5)	7 g/m <sup>2</sup>	ABTS-1743	<i>C. quinquefasciatus</i>	670
<b>VectoMax® CG (Lsp + Bti)</b>	Lsp (2,7) Bti (4,5)	5 g/m <sup>2</sup>	AM65-52 (Bti) e ABTS 1743(Lsp)	<i>A. aegypti</i> e <i>C. quinquefasciatus</i>	50
<b>Vectobac® WDG</b>	Bti (37,4)	1 g/m <sup>2</sup>	AM65-52	Água potável	3000

Fonte: A autora.

Nota: UTI- Unidade tóxica internacional.

### 7.3 Amostragem de *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*

Para amostragem dos mosquitos, as casas foram selecionadas de acordo com as condições operacionais para realização da coleta e a partir do consentimento dos moradores. As casas foram georeferenciadas e estavam numa distância aproximada de 10 a -15 metros entre si e a amostragem ficou espacialmente distribuída de forma que representasse toda a área de estudo. Durante o período de pré-intervenção (PI), foram realizadas coletas mensais para amostragem de densidade de larvas e pupas (março e abril-2010) e mosquitos adultos (setembro-2009 a abril-2010) de *C. quinquefasciatus* em fossas. Neste tipo criadouro também investigando a presença de *A. aegypti*. A densidade de ovos de *A. aegypti*, não foi avaliada durante a PI, sendo incluída posteriormente. A metodologia de coleta da PI e do período de intervenção (maio-2010 a maio-2013) está descrita nos itens subsequentes. Para cada índice entomológico, um grupo de casas foi selecionado em cada área, não ocorrendo a coleta de mais de um tipo de índice por casa.

### 7.3.1 Densidade de adultos (DA)

A coleta de adultos foi realizada em 15 imóveis em cada área de estudo (A1 e A2) durante os períodos de pré-intervenção e intervenção. As coletas aconteceram mensalmente, no intradomicílio dos imóveis através de aspiradores manuais (Modelo Horst Ltda-Me, São Paulo, BR) (Figura 6). Cada imóvel foi amostrado por três dias consecutivos, durante 15 minutos/dia. Os mosquitos coletados foram levados ao laboratório para contagem, sexagem e identificação das espécies.

**Figura 6-** Aspirador Manual (Modelo = Horst Ltda-Me, São Paulo, BR) utilizado para coleta de mosquitos.



Fonte: Fontes (2013)

### 7.3.2 Densidade de ovos, larvas e pupas (DLP) para *C. quinquefasciatus*

A coleta das formas imaturas dos mosquitos foi realizada em fossas com o objetivo de estimar a DLP antes e durante o período de intervenção, além de investigar a presença de *A. aegypti* nesse tipo de criadouro. Em cada fossa, cinco amostras (250 ml) na lâmina d'água, utilizando o método de *dipping* (Figura 7) ou conchada sendo realizada quatro delas em cada ângulo do criadouro, além de uma no centro. Dez fossas por área foram monitoradas durante a pré-intervenção e primeiro ano de intervenção. No segundo ano de intervenção, esse número foi reduzido para cinco por área, devido a iniciativas de reparos em fossas, canais e valetas na cidade, através do plano ambiental das construções, realizado pela Prefeitura do Recife (PAC, 2011). Essas amostras foram levadas para laboratório para identificação, contagem e registro de cada fase pré-imaginal (ovo, larva e pupa).

**Figura 7-** Coleta de formas imaturas de culicídeos em fossas, através do método *dipping*.



Fonte: Fontes (2013)

### 7.3.3 Densidade de ovos (DO)

Neste estudo, a densidade de ovos de *A. aegypti* nas áreas foi estimada a partir da coleta utilizando armadilhas de oviposição, ou ovitrampas (modificada por Regis et al. (2008). Esta armadilha é constituída por um recipiente preto, com capacidade de 1l, contendo duas palhetas de eucatex (5x15 cm), que serviram como suportes de oviposição, 200 ml de infusão de gramínea (30%) como atraente de oviposição e 2 g de Bti (Vectobac WG) para evitar o desenvolvimento de larvas que pudessem eclodir. Em cada área, 30 imóveis receberam uma ovitrampa no peridomicílio. A manutenção das armadilhas aconteceu a cada 30 dias, quando foi realizada a coleta das palhetas e sua respectiva substituição, assim como a reposição do atraente e do biolarvicida Bti. As palhetas contendo os ovos coletados em cada mês foram levadas ao laboratório para contagem.

Uma sinopse dos instrumentos utilizados para amostragem da população de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* encontram-se descritos no quadro 4.



**Quadro 4** - Sinopse dos índices entomológicos de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*, utilizados para a execução do projeto no bairro de Água Fria, Recife-PE.

Objetivo	Espécie	Instrumentos	Amostragem	Periodicidade
Densidade de Adultos	<i>A. aegypti</i> e <i>C. quinquefasciatus</i>	Aspirador	15 imóveis	Mensal (Aspiração 15min/três dias/casa)
Densidade de ovos	<i>A. aegypti</i>	Ovitampa	30 imóveis	Mensal (1 ovitampa/casa)
Densidade de formas pré-imaginais	<i>A. aegypti</i> e <i>C. quinquefasciatus</i>	Concha (conchada)	10 fossas- Ano 1 5 fossas- Ano 2 e 3	Mensal

Fonte: a autora.

#### 7.4 Análise de suscetibilidade de *Culex quinquefasciatus* a Lsp

##### 7.4.1 Análise das amostras

Para realização dos bioensaios de dose-resposta, jangadas contendo ovos desta espécie foram coletadas através da armadilha de oviposição BR-OVT (BARBOSA et al., 2007) (Figura 8). Estes ovos foram destinados especificamente para os estudos de suscetibilidade das populações de *C. quinquefasciatus* a Lsp, e da frequência dos alelos de resistência a esse larvicida descrito no item 7.4.2 e 7.4.3. A cada semestre, as armadilhas BR-OVT foram instaladas no peridomicílio de 15 residências de cada área, e mantidas em campo por dois meses, por área, totalizando seis momentos de coleta durante três anos de estudo. As jangadas foram recolhidas das armadilhas duas vezes por semana e a cada 30 dias foi realizada a manutenção, que consisti na troca de água e tratamento com Bti. Os ovos foram levados para o insetário, e postos para eclodir conjuntamente. Em seguida os grupos de larvas do 1º instar foram distribuídas em outros recipientes e mantidas, a fim de obter amostras representativas das coletas realizadas nas 15 residências de cada área. Larvas do final do 3º estágio (L<sub>3</sub>) e/ou início do 4º estágio (L<sub>4</sub>) foram utilizadas nos bioensaios e foram armazenadas a -80°C para extração de DNA.

**Figura 8** - Armadilha (BR-OVT) para a coleta de jangadas (ovos) de *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: Xavier (2013).

#### 7.4.2 Bioensaios

Bioensaios de dose-resposta foram realizados conforme o protocolo da OMS. Grupos de 20 larvas em triplicatas foram expostas à diferentes concentrações (7-8) de pó liofilizado *Lysinibacillus sphaericus* SPH88 cepa 2362 (Instituto Pasteur), em recipientes plásticos com 100 ml de água destilada. As concentrações avaliadas causaram uma curva de mortalidade entre 10 e 98% das larvas. Um grupo controle, não tratado, foi utilizado em triplicata em cada avaliação. Cada bioensaio foi repetido pelo menos três vezes em diferentes datas. As concentrações letais para 50 e 90% das larvas ( $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ ) após 48 horas de exposição ao Lsp foram determinadas por análise de próbites (FINNEY, 1971), usando o programa SPSS 8.0 para Windows. A susceptibilidade das populações de *C. quinquefasciatus* das áreas 1 e 2 foram avaliadas semestralmente, totalizando seis avaliações por área, além do período de pré-tratamento, em que uma única avaliação foi realizada representando ambas as áreas.

#### 7.4.3 PCR para detecção dos alelos de resistência do gene *cqm1*

A frequência de alelos de resistência do gene *cqm1* foi avaliada através do método de PCR (CHALEGRE et al., 2009). Foram avaliadas amostras entre 222 e 515 larvas por área em cada momento de análise, totalizando cinco avaliações em cada área de estudo, além de um momento de pré-intervenção. A extração de DNA genômico das larvas foi realizada individualmente, e o reagente DNazol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), foi utilizado de acordo com instruções do fabricante. O DNA obtido foi precipitado com etanol e ressuspendido

em tampão Tris-EDTA, e as amostras foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop 2000c<sup>®</sup> (Thermoscientific) e sua concentração padronizada (25 ng/μl) para uso nas reações de PCR.

As reações de PCR alelo específica e a avaliação dos produtos amplificados foram executadas baseado no protocolo de Chalegre et al. (2009). Para a amplificação de um fragmento dos alelos, foram utilizados “primers” (Forward 5’-CGAGAATTCATGCAGGAC TTCAAAGAG-3’; Reverse 5’-GCACTGCAGGGAAGTGGTGGGAAGGTAC-3’). Os primers flanqueiam uma região nucleotídica de 208 pb que contém mutações de 16, 19 e 25 pb associadas à resistência, correspondente aos alelos, *cqm1<sub>REC</sub>*, *cqm1<sub>REC-D16</sub>*, *cqm1<sub>REC-D25</sub>*. Uma amostra contendo o DNA de *A. aegypti*, e uma amostra sem conter DNA molde, foram os controles negativos usados em cada reação. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 μl contendo 0,2 mM de cada dNTP, 2U de *Taq* DNA Go *Taq* (Promega), 1,4 mM de MgCl<sub>2</sub>, além de 2 μl de DNA (25 ng/μl) molde extraído individualmente das larvas. Cada amostra foi amplificada em um termociclador BIOMETRA<sup>®</sup>, programado para uma etapa de desnaturação (94 °C por 3 minutos), seguido por 35 ciclos de 94°C por 50 s e temperaturas de anelamento de 55° C por 1 min e extensão de 72°C por 120 segundos e uma etapa final de 72 °C por 10 min. Os produtos gênicos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5%. Quando fragmentos com tamanho menor que 208 pb potencialmente amplificados devido a existência de uma deleção que caracteriza um dos alelos (*cqm<sub>REC-D19</sub>*, *cqm<sub>REC-D16</sub>*, *cqm1<sub>REC-D25</sub>*), foram detectados, estas amostras foram submetidas a novas reações de PCR, para obtenção de DNA purificado com o Kit GFX DNA and gel band purification para ser enviado para identificação por sequenciamento. Este realizado no ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) realizado no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM.

## 7.5 Análises de dados

O impacto da atividade biolarvicida foi expresso através da média e desvio padrão de ovos, larvas/pupas e mosquitos adultos coletados mensalmente, anualmente ou por avaliação. A normalidade dos dados foi testada usando Shapiro-Wilk, e a homogeneidade das variâncias, através do teste de Levene. Dados não normais foram transformados em Log, e os dados que não puderam ser transformados foram submetidos a testes estatísticos não paramétricos. Diferenças entre os tratamentos quanto ao número de adultos coletados foram avaliados

através da análise de variância (ANOVA) e os tratamentos foram comparados utilizando teste de Tukey *a posteriori*. As análises comparativas das formas pré-imaginais foram realizadas utilizando o teste Kruskal-Wallis. A associação entre densidade de adultos e precipitação durante o período de estudo foi testada através da correlação de Spearman. Pontos de coleta foram considerados positivos, quando detectada a presença de pelo menos um ovo/jangada, larva, pupa ou mosquito adulto foi detectado em um criadouro ou casa avaliada.

#### 7.6 Considerações éticas

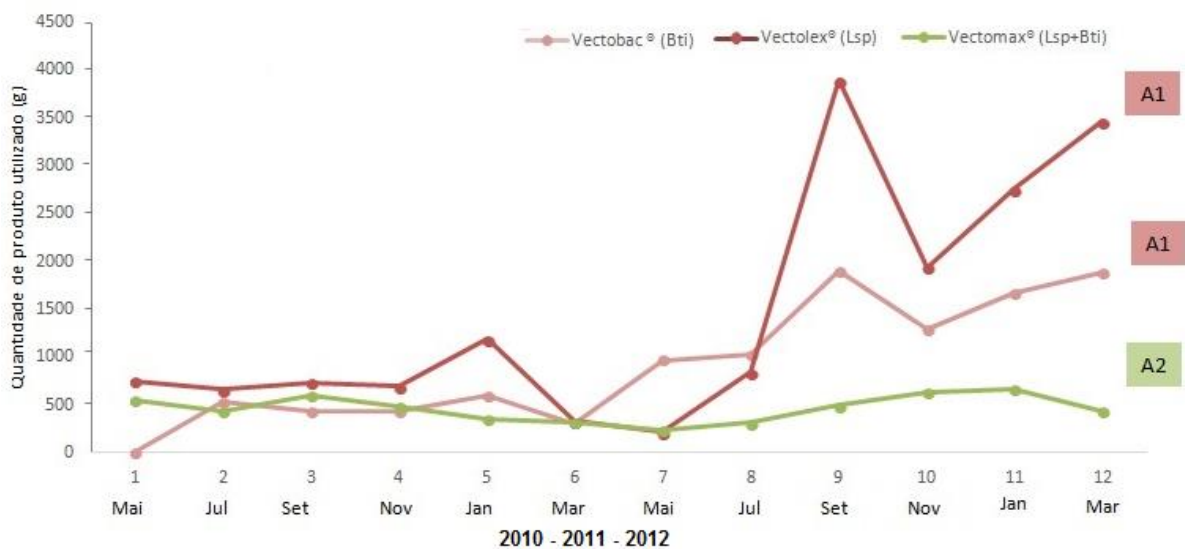
Foi solicitado o consentimento individual de todos os domicílios para o acesso necessário à coleta de mosquitos adultos e /ou monitoramento e controle de habitat larval . O Certificado de Apresentação para Atenção Ética (CAAE) foi registrado sob o número 0004.0.095.000-10.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Operacionalidade

Em cada ciclo, o número de criadouros tratados nas áreas de avaliação foi entre 500 e 700. Esses dados foram disponibilizados pela Secretaria de Saúde da cidade do Recife. A quantidade de produtos utilizados por ciclo de tratamento e a extensão dos criadouros tratados em m<sup>2</sup> podem ser visualizados na figura 9. Os tipos de criadouros tratados e as respectivas quantidade de produto utilizado estão expostos na tabela 1.

**Figura 9** - Consumo de biolarvicidas e superfície tratada no bairro de Água Fria nas áreas 1 (VectoBac<sup>®</sup>- Bti e VectoLex<sup>®</sup> G ) e 2 (VectoMax<sup>®</sup> WSP) durante os primeiros 12 Ciclos de avaliação.



Fonte: a autora.

**Tabela 1-** Criadouros de *Aedes aegypti* e de *Culex quinquefasciatus* descritos nas A1 e A2 de Água Fria, Recife, Brazil, no período de maio 2010 a abril 2012 e média de larvicidas VectoLex® G, Vectobac® G, Vectobac® WDG ou VectoMax® CG utilizados por ciclo de tratamento nas áreas de estudo.

Espécies	Criadouros	Area 1					Area 2			
		CM	CT	Vectolex® (g) <sup>a</sup>	Vectobac WG®(g) <sup>b</sup>	Vectobac WDG®(g) <sup>c</sup>	CM	CT	Vectomax® (g) <sup>d</sup>	VectobacWDG®(g) <sup>c</sup>
		(Média ± DP/Ciclo)					(Média ± DP/Ciclo)			
<i>A. aegypti</i>	Tanque de água conectado a rede de esgoto	124.25±39.9	3.75± 4.8	9.98±21.5	30.57±38.57	2.9±7.85	51.25±14.01	6±9.98	7.33±21.86	6.84±7.5
	Barris, vasos de barro e poços	1257.33±435.26	28.83±34.77	13.83±8.66	1.42±3.43	0	1250.33±128,27	294.75±89.12	43.33±46.87	130.05±37.42
	Recipientes com água	969.61±403.55	6.25±4.95	7.78±12.37	25.99±43.99	1.86±2.75	1574.54±273.04	72.34±34.42	21.93±12.49	13.86±5.75
	Tanques, piscina em desuso	5.25±5.35	3±3.14	0	14.60±0.38	17.41±3.39	3±2.22	1.75±1.05	0.35±0.68	1.77±0.8
	Recipientes diversos (plásticos, garrafas, latas)	75.83±82.34	2.58±4.5	0.16±0.38	8.53±14.14	1±3.46	171.03±96.05	9.6±10.5	8.67±10.96	1.05±1.71
<i>C. quinquefasciatus</i>	Fossas sépticas	173.41±91.47	69.5±69.2	1237.85±1158.7	0	0	50.16±32.07	31.41±13.54	326.91±133.11	0
	Cisternas	0.75±1.3	0.33±0.8	4.83±9.44	0	0	1.83±3.15	0.58±2	0.98±2.86	0
	Valetas	10.91±17.42	0	0	0	0	0.33±1.16	0.16±0.4	0.083±0.3	0
	Canal	0.33±1.54	0	0	0	0	4±2.6	0.083±0.3	0	0
	Caixa de inspeção	2±3.16	0	0	0	0	11.75±6.13	10.6±4.2	10.3±6.7	0

Nota:

CM - Criadouros monitorados.

CT Criadouros tratados.

<sup>a</sup> Vectolex® - Lsp aplicado em criadouros de *C. quinquefasciatus*.

<sup>b</sup> Vectobac® G- Bti aplicado em criadouros de *A. aegypti*.

<sup>c</sup> Vectobac® WDG- Bti aplicado em reservatórios de água para consumo humano.

<sup>d</sup> VectoMax®CG - Lsp e Bti aplicado em criadouros de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*.

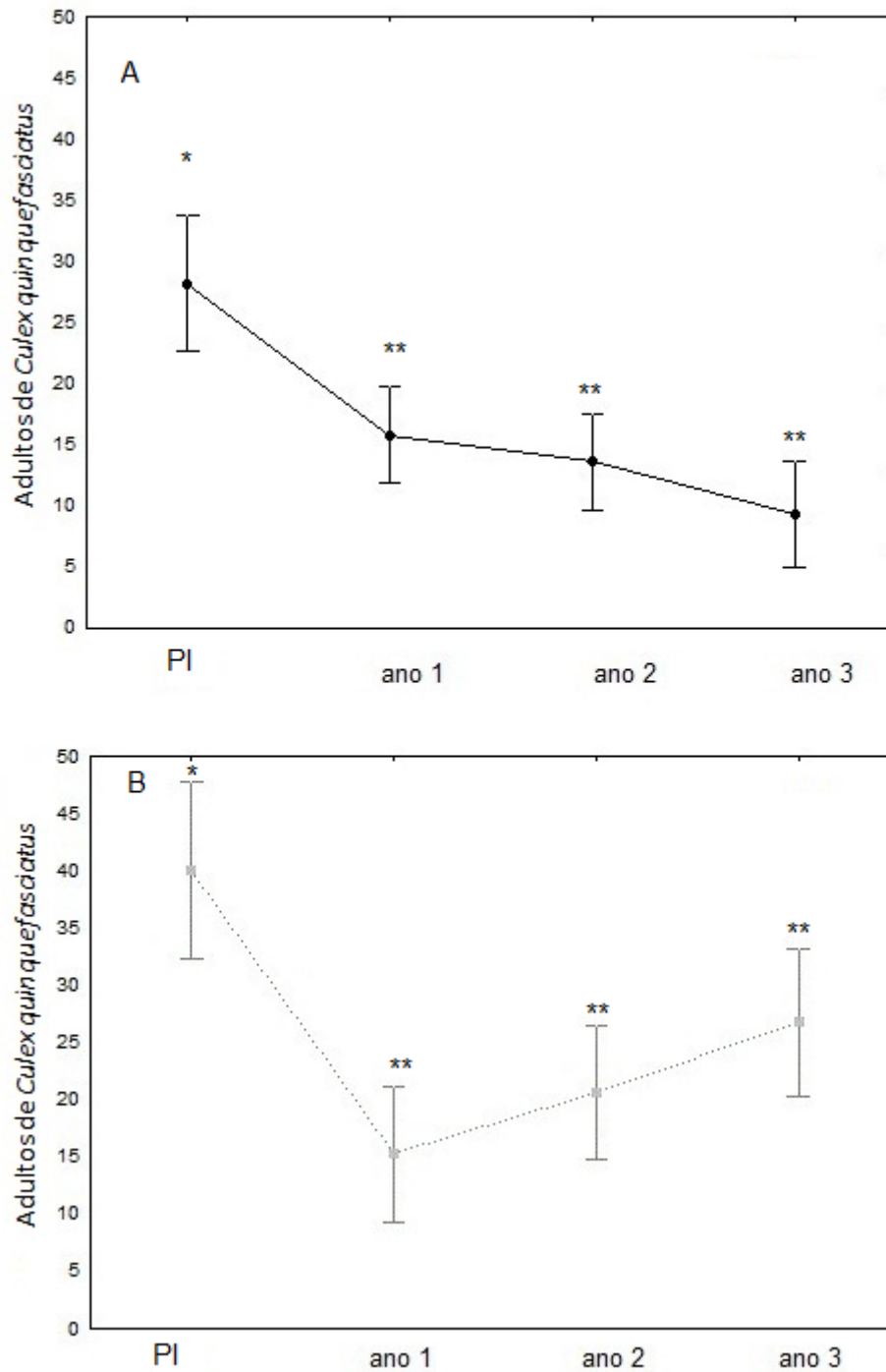
## 8.2 Avaliação do tratamento com biolarvicidas na densidade de *Culex quinquefasciatus*

### 8.2.1 Adultos

O tratamento dos criadouros resultou numa redução no número de mosquitos adultos coletados quando comparamos ao período pré-intervenção (PI). Um total de 23.831 mosquitos adultos de *C. quinquefasciatus* foram retirados do ambiente através das coletas por aspirador durante todo o período de avaliação dos quais, 9.190 na A1 e 14.641 na A2. Em ambas as áreas avaliadas, observou-se uma redução acentuada no número de mosquitos adultos coletados após o início do período de intervenção (Figura 10 e Figura 11A). Na A1 a redução foi de 43,8% e na área 2 foi de 61,9% no primeiro ano de avaliação, e estas diferenças foram significativas entre os períodos avaliados na A1 ( $F=9,55$ ;  $GL=3,592$ ;  $p=0<0,0005$ ) e A2 ( $F = 8,94$ ,  $GL = 3,609$ ,  $p < 0,005$ ) (Figura 10A e B). Na A1, o número de mosquitos coletados no pré-intervenção (PI) (setembro 2009 a abril de 2010) foi significativamente maior que o número de mosquitos coletados nos anos 1 ( $p<0,005$ ), 2 ( $p<0,005$ ) e 3 ( $p<0,005$ ) (Figura 10A e Figura 11A). Nesta área, o número médio de mosquitos coletados durante o PI foi de  $28,2 \pm 43,80$  mosquitos/imóvel/mês, valor três vezes maior do que a média de no ano 3 ( $9,33 \pm 9,8$  imóvel/mês) (Tabela 2). Dados semelhantes foram observados na área 2 ( $F= 8,94$ ,  $GL= 3,609$ ,  $p<0,05$ ), onde houve uma redução significativa no número de mosquitos coletados nos anos 1 ( $p < 0,005$ ), 2 ( $p < 0,05$ ) e 3 ( $p < 0,05$ ) comparado ao período de PI (Figura 10B) (Tabela 2). Durante a PI na A2, a média de *C. quinquefasciatus* foi de  $40,0 \pm 57,8$  mosquitos/imóveis/mes, após um ano de aplicação do produto VectoMax<sup>®</sup> CG essa média foi reduzida para  $15,3 \pm 32,4$  mosquito/imóvel/mês, uma redução 38,1% (Tabela 2).

Na A1, 56,7% dos mosquitos coletados foram fêmeas e 43,3% machos. Percentuais semelhantes foram detectados na A2 com 54,8% (fêmeas) e 45,2% (machos). Durante o estudo, foram detectadas flutuações mensais na densidade de *C. quinquefasciatus*, que não foram significativamente correlacionadas com a precipitação ( $p < 0,05$ ) (Figura 11A).

**Figura 10** - Análise de Variância (ANOVA) do número de *Culex quinquefasciatus* adultos coletados durante o pré-intervenção e intervenção (ano 1, 2 e 3) no Bairro de Água Fria, Recife-PE.



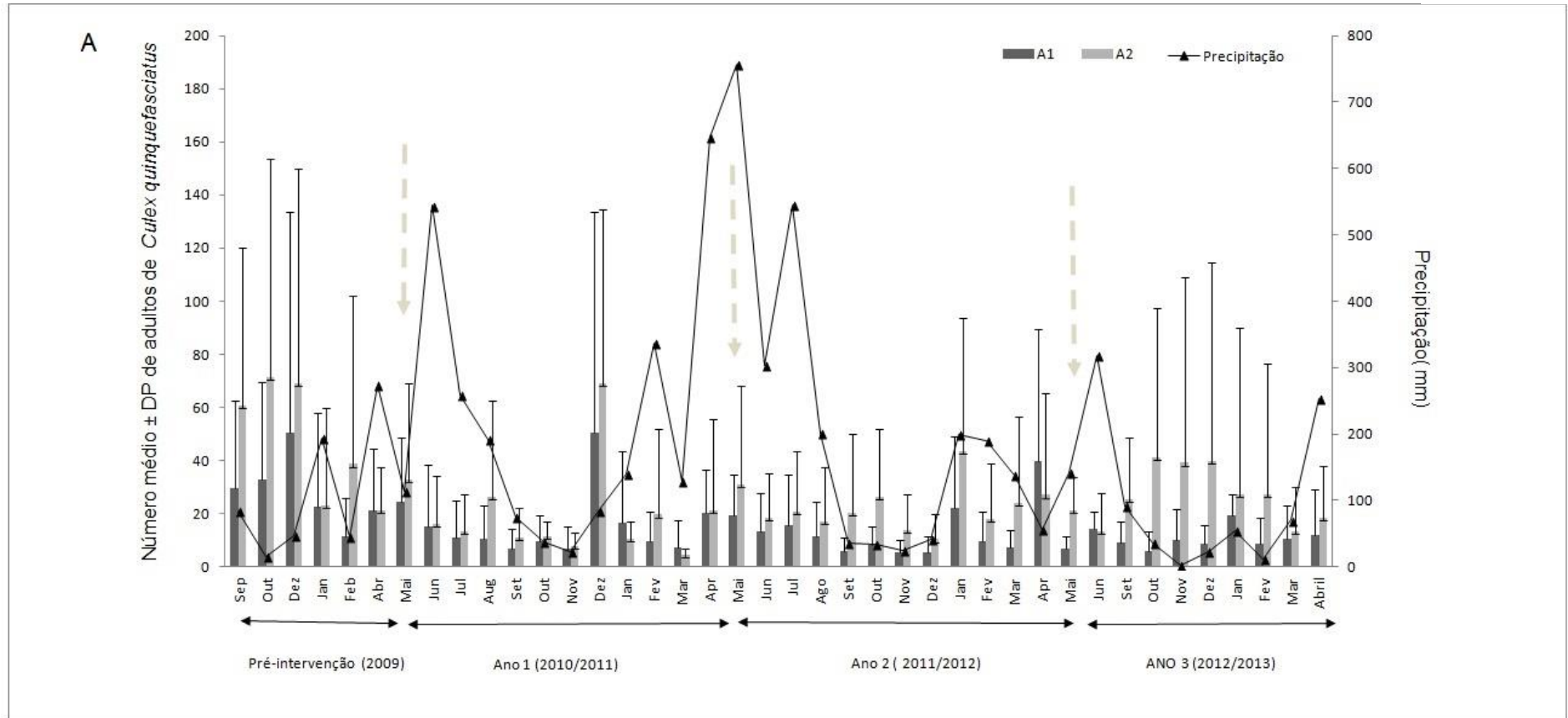
Fonte: A autora.

Nota : A) Área 1 (VectoBac® e VectoLex® G ; B) Área 2 (VectoMax® CG). Colunas seguidas do símbolo (\*\*) não diferem estatisticamente entre si, avaliado a partir do teste de Tukey a posteriori. PI- Pré-intervenção.



**Figura 11-** Densidade de *Culex quinquefasciatus* e precipitação na A1 e A2. Criadouros foram tratados com VectoLex® G (Lsp) e VectoMax® CG (Lsp+Bti) respectivamente.

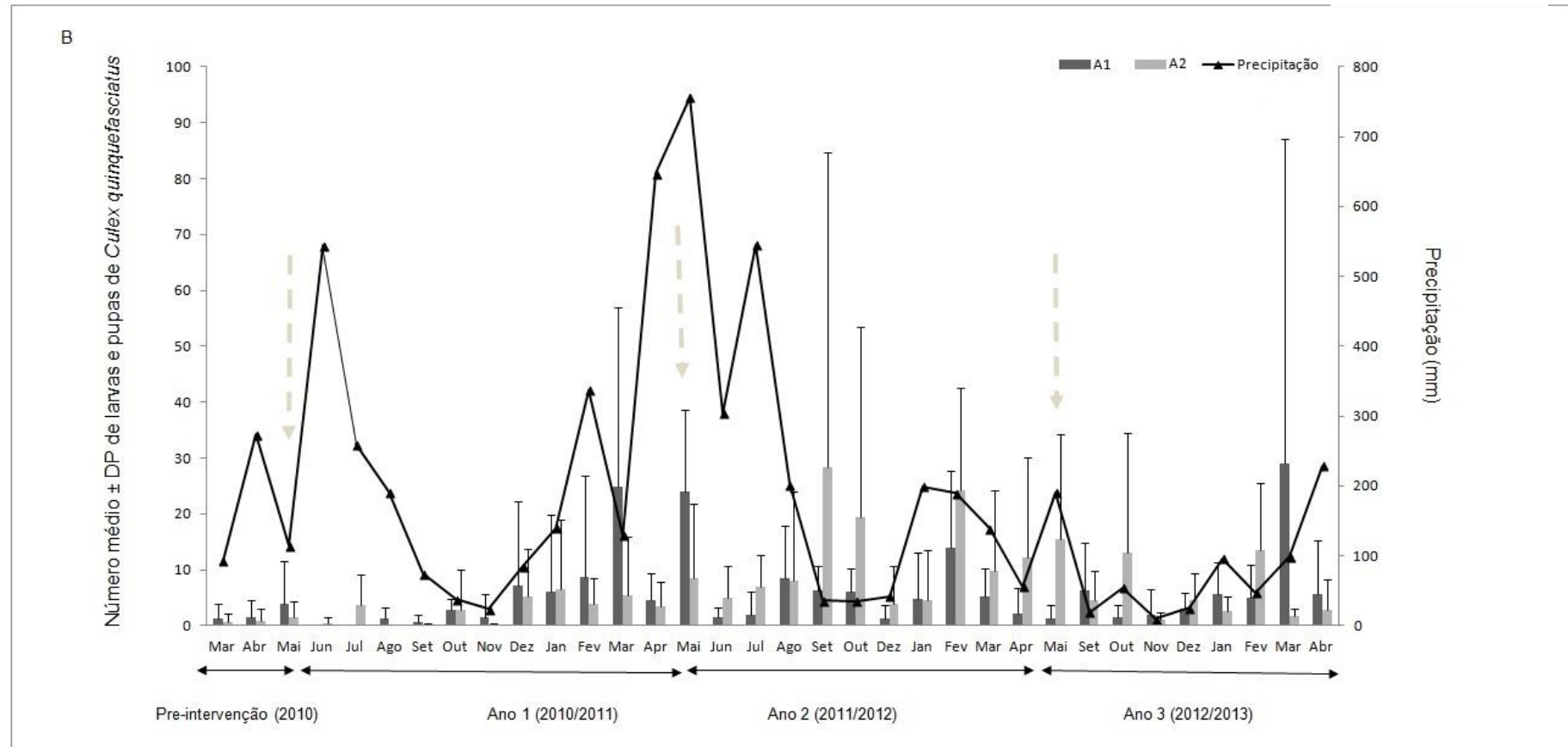
(continua)



Legenda: A) Adultos.

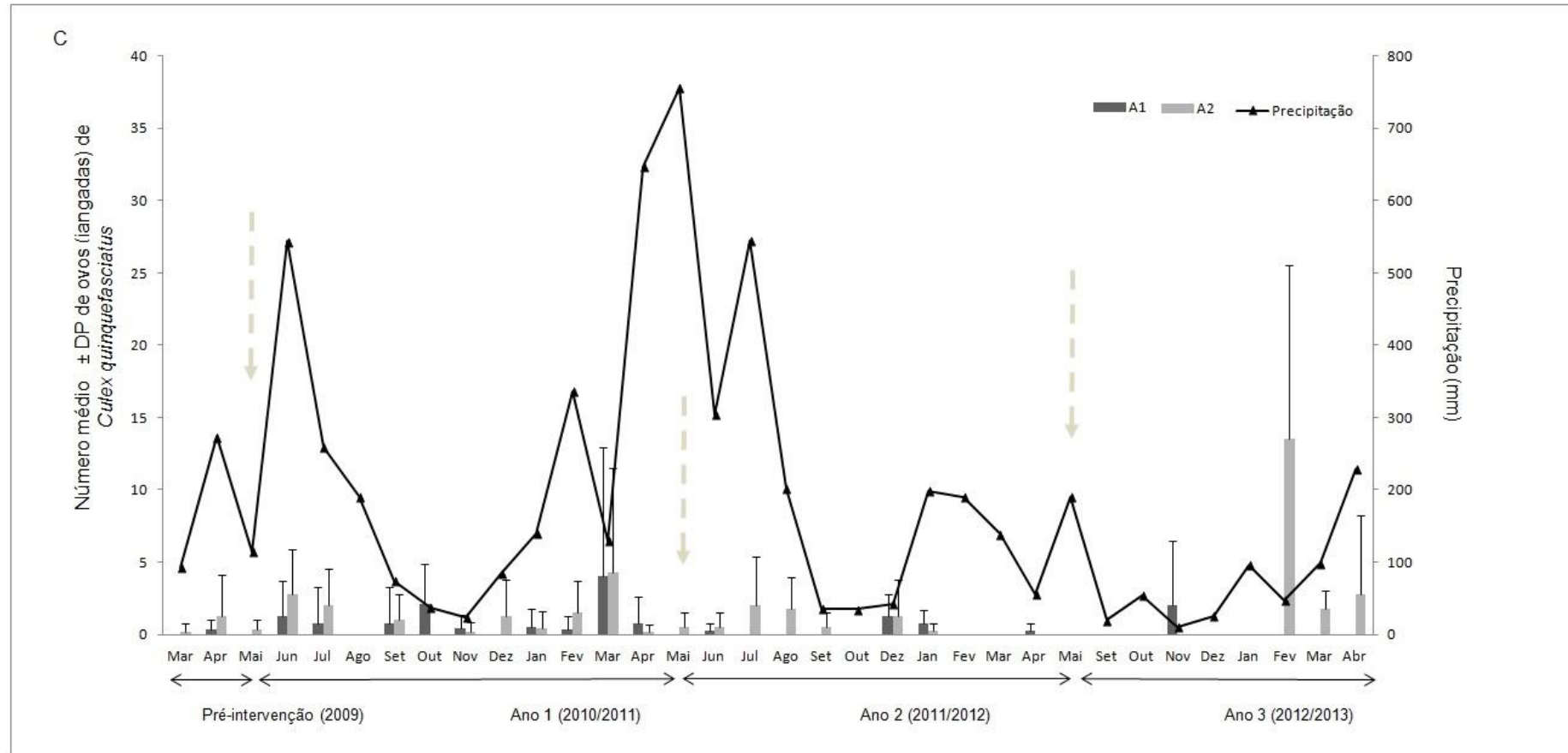
**Figura 11-** Densidade de *Culex quinquefasciatus* e precipitação nas áreas 1 (A1) e 2 (A2). Criadouros foram tratados com VectoLex® G (Lsp) e VectoMax® CG (Lsp+Bti) nas áreas 1 e 2 respectivamente.

(continuação)



Legenda: B) Larvas e pupas.

**Figura 11-** Densidade de *Culex quinquefasciatus* e precipitação na A1 e A2. Criadouros foram tratados com VectoLex® G (Lsp) e VectoMax® CG (Lsp+Bti) respectivamente.



Fonte: A autora.

Legenda: C) Ovos (jangada).

Nota: Barras representam médias  $\pm$  desvio padrão e linhas representam a soma da precipitação mensal durante o período de pré-intervenção e intervenção. Setas indicam início de avaliação anual.

**Tabela 2** - Número médio e desvio padrão de ovos  $\pm$  DP de ovos (jangadas), larvas e pupas e adultos de *C. quinquefasciatus* nas áreas 1 e 2, realizados no bairro de Água Fria, Recife-PE, detectadas no período pré intervenção e durante a intervenção (Ano 1, 2, 3).

Fase	Área	Período			
		Pré-intervenção	Ano 1	Ano 2	Ano 3
<b>Jangadas de ovos</b>	A1	0,1 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 2,4	0,2 $\pm$ 0,6	0
	A2	0,7 $\pm$ 2,0	0,9 $\pm$ 2,2	0,61 $\pm$ 1,5	1,8 $\pm$ 5,4
<b>Larvas/pupas</b>	A1	1,4 $\pm$ 6,9	4,2 $\pm$ 13,9	4,9 $\pm$ 6,5	5,8 $\pm$ 1,7
	A2	0,7 $\pm$ 1,8	2,5 $\pm$ 5,6	11,9 $\pm$ 21,7	5,8 $\pm$ 0,4
<b>Adultos</b>	A1	28,15 $\pm$ 43,8	15,81 $\pm$ 30,2	13,62 $\pm$ 21,0	9,3 $\pm$ 9,8
	A2	40,02 $\pm$ 57,8	15,26 $\pm$ 32,4	20,6 $\pm$ 28,4	26,7 $\pm$ 4

Fonte: A autora.

### 8.2.2 Formas pré-imaginais

A densidade de larvas/pupas em criadouros de *C. quinquefasciatus* não foi reduzida durante o período de avaliação nas áreas 1 e 2 (Figura 11B). Um total de 2.104 larvas e pupas de *C. quinquefasciatus* foram coletadas durante os três anos de intervenção, sendo 1.044 na área 1 e 1.060 na A2. Na área 1, o número de larvas e pupas coletados na PI não diferiu significativamente do período de tratamento (Figura 11B). Nessa área, um maior número de larvas e pupas foi coletado no ano 3, uma média de  $5,8 \pm 1,7$  LP/imóvel/mês. Na A2, um número significativamente maior de larvas e pupas (LP) foram coletadas no ano 2 ( $F = 7,73$ ;  $GL = 3,210$ ;  $p < 0,05$ ) comparado ao PI ( $p < 0,05$ ) e ano 1 ( $p < 0,05$ ). O número médio de indivíduos coletados nas fases pré-imaginais da A2 no ano 2 foi de  $11,9 \pm 21,71$  LP/imóvel/mês, enquanto que no PI e ano 1 foi de  $0,7 \pm 1,8$  e  $2,5 \pm 5,6$  LP/imóvel/mês, respectivamente (Tabela 2).

Nas fossas monitoradas constatamos a presença de jangadas. Durante todo o estudo, um total de 243 jangadas foi coletado em ambas as áreas, sendo 101 na A1 e 142 na A2. No PI a média de jangadas obtida foi de  $0,1 \pm 0,4$  na A1 e de  $0,7 \pm 2,0$  jangadas/fossa/mês na A2 (Tabela 2), não sendo observada diferença significativa entre os períodos e áreas de avaliação. O número médio de jangadas na A2 foi de  $0,9 \pm 2,2$  LP/imóvel/mês no ano 1 e de  $0,6 \pm 1,5$  e  $1,8 \pm 5,4$  LP/imóvel/mês, nos anos 2 e 3 respectivamente. Na área 1, no período de fevereiro de 2012 a abril de 2013 nenhuma jangada foi coletada nas fossas (Figura 11C). A A2 também se caracterizou pela ausência de jangadas durante os meses de maio/2012 a jan/2013. A maior média observada aconteceu na área 2 no mês de fevereiro de 2012 com  $13,5 \pm 12,0$ , jangadas por fossa (Figura 11 C).

### 8.2.3 Avaliação de índices entomológicos para detecção de *Culex quinquefasciatus*

Diferentes índices de positividade foram encontrados para as fases de desenvolvimento de *C. quinquefasciatus* (ovo, larva, pupa e adulto) (Tabela 3). O maior percentual de coletas positivas foi para a fase adulta. Durante o PI, foi de 100% na A1 e 96,2% na A2, sendo mantidos altos índices de positividade (84 - 100%) durante todo estudo. O menor percentual alcançado (84%) das residências positivas para a presença de *C. quinquefasciatus* na A2. Durante o PI, utilizando o número de jangadas (ovos) coletadas nas fossas, o índice de positividade variou entre 10% na A1 e 25% na A2. No mesmo período, a positividade de larvas e pupas foi 35% e 20% para a área 1 e 2, respectivamente. Durante 36 meses de

avaliação, o maior índice de positividade para jangadas foi de 23,2% no ano 2- área 2, chegando a não ser detectada a presença de ovos na área 1 no ano 3. Para larvas e pupas nas áreas 1 e 2 os maiores percentuais foram também observados nos anos 2 (62,8%) e 3 (66,7%) respectivamente.

**Tabela 3-** Percentual de coletas positivas para presença de *Culex quinquefasciatus* nas áreas (A1 e A2), no bairro de Água Fria, Recife-PE, utilizando diferentes índices para coleta em períodos de pré-intervenção (PI) e intervenção durante três anos (1, 2, 3).

Fase	Área	PI	Ano 1 (%)	Ano 2 (%)	Ano 3 (%)
<b>Jangadas (ovos)</b>	A1	10	16,2	13,9	0
	A2	25	23,1	23,2	20,5
<b>Larvas/pupas</b>	A1	35	32,1	62,8	52,4
	A2	20	33,4	60,5	66,7
<b>Adultos</b>	A1	100	87,6	87,7	87,7
	A2	96,19	84,2	93,3	97,3

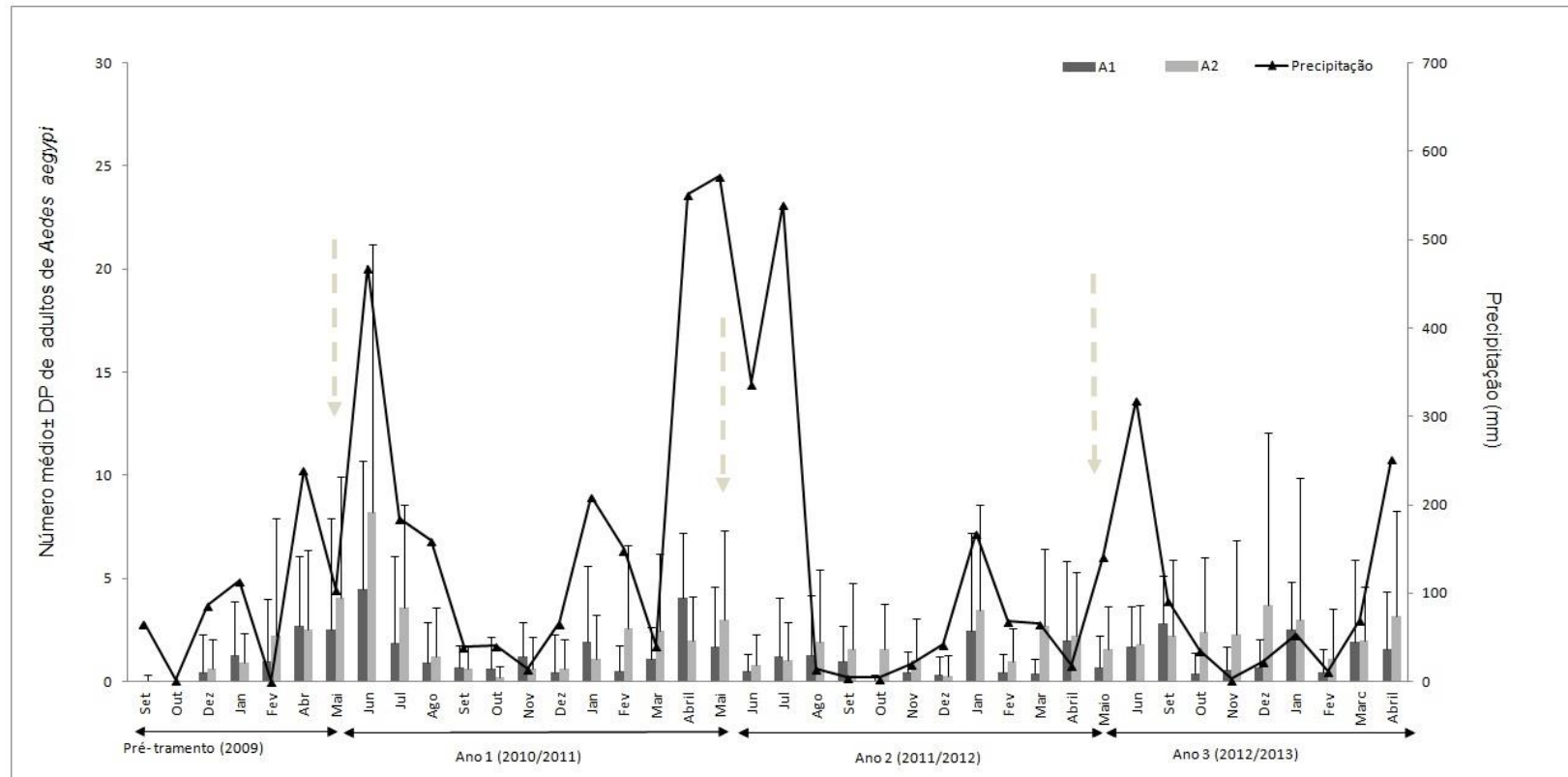
Fonte: A autora.

### 8.3 Avaliação dos tratamentos com biolarvicidas sobre a densidade de *Aedes aegypti*

#### 8.3.1 Adultos

O número de adultos de *A. aegypti* não variou significativamente durante os períodos de pré-intervenção e os três anos subsequentes de avaliação. Durante o PI essa média foi de  $0,9 \pm 2,4$  (A1) e  $1,3 \pm 3,2$  (A2) mosquito/imóvel/mês. A média de *A. aegypti* coletados durante o estudo variou de  $1 \pm 2,4$  a  $1,7 \pm 3,4$  mosquito /imóvel/mês na A1. Na A2 a média foi de  $1,7 \pm 3,0$  a  $2,2 \pm 4,5$  mosquito/imóvel/mês. Na figura 12 é possível observar as flutuações no número de mosquitos coletados/mês/casa e esses valores não ultrapassam um número médio de 10 mosquito/mês (Figura 12).

**Figura 12** - Densidade de *Aedes aegypti* adulto e precipitação mensal registrada nas áreas A1 e A2 de estudo.



Fonte: A autora

Nota: Os sítios de oviposição de *A. aegypti* foram tratados com VectoBac WG® (Bti) e VectoMax® WSP (Lsp + Bti) em A1 e A2, respectivamente. As barras com marcadores representam médias mensais  $\pm$  SE; As linhas representam as somas mensais durante os períodos de pré-intervenção e intervenção e as setas indicam o início dos tratamentos anuais

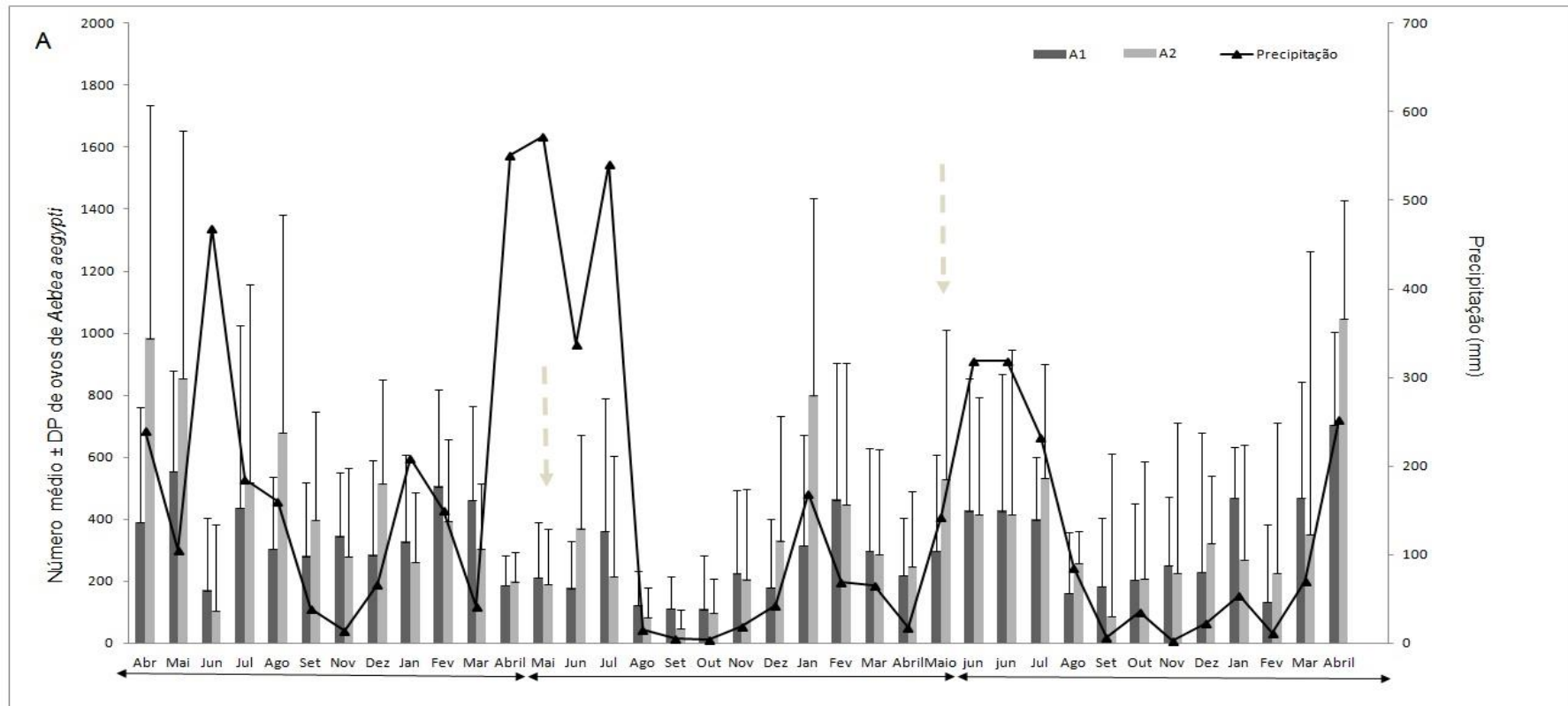
### 8.3.2 Ovos

Por meio de ovitrampas permitiu detectar-se a presença de *A. aegypti* em 98,1% das residências avaliadas durante os três anos de estudos (Figura 13A). Foram observadas flutuações na densidade de ovos em ambas as áreas, independentemente do tipo de intervenção realizada. Para esse parâmetro não foi realizada uma avaliação pré-intervenção. A média geral dos três anos de coleta de ovos obtida na A1 foi de  $313,25 \pm 376,27$  ovos/imóvel/mês; na A2 foi de  $311,5 \pm 380,47$  ovos/imóvel/mês, não havendo diferença estatística entre as áreas de estudo. No entanto, ao se avaliar os dados anualmente detectou-se variações significativas no número de ovos coletados entre os anos de avaliação ( $F = 20,89$ ;  $GL = 2,1337$ ;  $p < 0,05$ ). Na A1, no primeiro ano de tratamento, foi coletado um número significativamente maior de ovos ( $p < 0,05$ ) ( $405,85 \pm 330,72$ ) comparado aos anos 2 ( $351,13 \pm 336$ ) e 3 ( $233 \pm 284,36$ ) (Figura 13B). Da mesma forma, na A2 um número significativamente maior de ovos ( $F = 15,918$ ;  $GL = 2,684$ ;  $p < 0,05$ ) foi coletado no ano 1 ( $660,62 \pm 436,40$ /imóvel/mês), comparado aos anos 2 ( $p < 0,05$ ) e 3 ( $p < 0,05$ ), que apresentaram médias de  $415,1 \pm 480,81$ /imóvel/mês e  $501 \pm 351,29$ /imóvel/mês respectivamente (Figura 13B). Foram observadas flutuações mensais quanto ao número de ovos de *A. aegypti* postos em ambas as áreas, no período de agosto de 2011 até maio de 2013. Entretanto, nenhuma correlação entre o número de ovos postos e a precipitação ( $p < 0,05$ ).



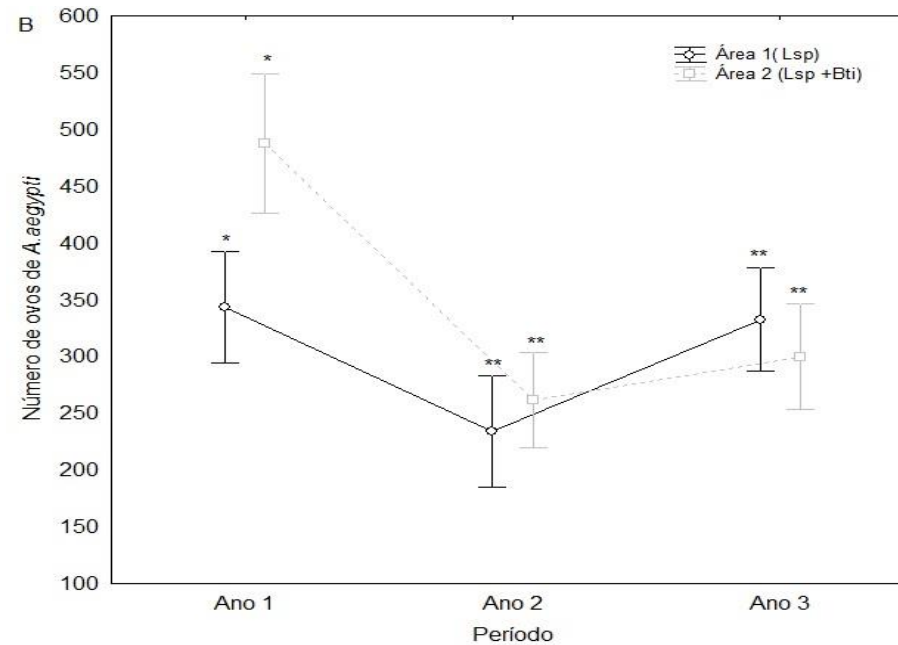
**Figura 13-** Densidade de ovos de *Aedes aegypti* durante os períodos de intervenção nas duas áreas de estudo, A1 e A2. Os sítios de oviposição de *A. aegypti* foram tratados com VectoBac WG® (Bti) e VectoMax® WSP (Lsp + Bti) em A1 e A2, respectivamente. As barras com marcadores representam médias mensais  $\pm$  SE; As linhas representam as somas mensais durante os períodos de pré-intervenção e intervenção e as setas indicam o início dos tratamentos anuais. A) número médio de ovos/mês e precipitação; B) Análise de Variância quanto ao número de ovos.

(continua)



Legenda: A) número médio de ovos/mês e precipitação.

**Figura 13-**Densidade de ovos de *Aedes aegypti* durante os períodos de intervenção nas duas áreas de estudo, A1 e A2. . Os sítios de oviposição de *A. aegypti* foram tratados com VectoBac WG® (Bti) e VectoMax® WSP (Lsp + Bti) em A1 e A2, respectivamente.. A) número médio de ovos/mês e precipitação; B) Análise de Variância quanto ao número de ovos.



Fonte: A autora.

Legenda: B) Análise de Variância quanto ao número de ovos.

**Nota:** As barras com marcadores representam médias mensais  $\pm$  SE; As linhas representam as somas mensais durante os períodos de pré-intervenção e intervenção e as setas indicam o início dos tratamentos anuais. Colunas seguidas pelo (\*\*) não diferem significativamente. Teste de Tukey a posteriori ( $P < 0,005$ ).

#### 8.4 Suscetibilidade de *Culex quinquefasciatus* a *Lysinibacillus sphaericus*

A suscetibilidade de larvas de *C. quinquefasciatus* ao Lsp nas populações das áreas 1 e 2 apresentaram variou em relação à colônia de referência (CqSF) (Tabela 4). Durante a PI, antes da utilização do VectoMax® CG, as áreas foram analisadas conjuntamente como uma única população, visto que eram submetidas ao mesmo esquema de tratamento com biolarvicidas Lsp e Bti. A  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  do Lsp para as larvas na PI foram de 0,014 e 0,032 mg/L, respectivamente. Nesta avaliação, detectou-se uma variação de suscetibilidade de 6 a 3 vezes em relação a  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  da colônia de referência, respectivamente. Nas duas primeiras avaliações, a A1 passou a apresentar  $RR_{50}$  maior do que 10 (12,6 e 10,42) enquanto que a A2 mostrou uma menor variação. Nas demais avaliações de  $RR_{50}$  mantiveram-se inferiores a 10, em relação às duas as áreas. Em relação a  $RR_{90}$ , os valores também variaram e apenas na avaliação 4 houve uma RR acima de 10 (~14) na A2, porém ocorreu de forma isolada. A avaliação global dos resultados mostra que, ao longo dos 36 meses de tratamento, as larvas de ambas as áreas mostraram variações de suscetibilidade ao Lsp, sem ter havido um aumento crescente da RR ao longo do tempo de exposição. Estes resultados indicam que não houve uma redução da suscetibilidade associada ao uso de biolarvicidas à base de Lsp nas duas áreas tratadas.

**Tabela 4** - Susceptibilidade de larvas de 4º instar de *Culex quinquefasciatus* ao *Lysinibacillus sphaericus* SPH88 (Instituto Pasteur).

Período/ população	CL <sub>50</sub> (mg/L)	RR <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub> (mg/L)	RR <sub>90</sub>
CqSF	<b>0,002</b> (0,002 - 0,004)	1	<b>0,012</b> (0,009 - 0,0181)	1
<b>Pré-intervenção</b> (A1 e A2)	<b>0,014</b> (0,010 - 0,018)	7	<b>0,032</b> (0,026-0,043)	2,7
<b>M 1</b>				
A1	<b>0,029</b> (0,026 - 0,033)	14,5	<b>0,053</b> (0,048 - 0,061)	4,4
A2	<b>0,005</b> (0,029 - 0,006)	2,5	<b>0,070</b> (0,035 - 0,026)	5,8
<b>M 2</b>				
A1	<b>0,024</b> (0,021 - 0,028)	12	<b>0,050</b> (0,042 - 0,059)	4,2
A2	<b>0,008</b> (0,006 - 0,012)	4	<b>0,034</b> (0,024 - 0,053)	2,8
<b>M 3</b>				
A1	<b>0,011</b> (0,009 - 0,021)	5,5	<b>0,037</b> (0,031 - 0,059)	3,1
A2	<b>0,007</b> (0,004 - 0,010)	3,5	<b>0,113</b> (0,053 - 0,426)	9,4
<b>M 4</b>				
A1	<b>0,009</b> (0,006 - 0,010)	4,5	<b>0,092</b> (0,049 - 0,261)	7,7
A2	<b>0,017</b> (0,013 - 0,025)	8,5	<b>0,172</b> (0,094 - 0,448)	14,3
<b>M 5</b>				
A1	<b>0,0004</b> (0,0002 - 0,0011)	0,2	<b>0,006</b> (0,0009 - 0,0139)	0,5
A2	<b>0,0012</b> (0,0007 - 0,0015)	0,6	<b>0,024</b> (0,0081 - 0,026)	2
<b>M 6</b>				
A1	<b>0,010</b> (0,001 - 0,028)	5,0	<b>0,071</b> (0,026 - 0,104)	5,9
A2	<b>0,010</b> (0,008 - 0,015)	5,0	<b>0,048</b> (0,026 - 0,067)	4,0

Fonte: A autora.

Nota: As larvas utilizadas nos bioensaios foram da colônia de laboratório (CqSF) e da população de campo exposta ao VectoLex<sup>®</sup> G (A1) e VectoMax<sup>®</sup> CG (A2). Foram analisadas larvas coletadas no período de pré-intervenção (PI) e em seis momentos (M1-M6) durante os três anos de intervenção.

### 8.5 Detecção de alelos do gene *cqm1* *Culex quinquefasciatus* que conferem resistência a *Lysinibacillus sphaericus*

O método de PCR, descrito em Chalegre et al. (2009), é capaz de identificar alelos que contêm deleções nesta região incluindo os alelos *cqm1*<sub>REC</sub>, *cqm1*<sub>REC-D16</sub>, *cqm1*<sub>REC-D25</sub>. A identidade de cada um desses alelos foi feita através de sequenciamento, que revelou a deleção específica presente no fragmento amplificado. O padrão de fragmentos amplificados a partir do gene *cqm1* para indivíduos homozigotos suscetíveis, heterozigotos e homozigotos para os alelos de resistência acima descritos pode ser observado na Figura 14. Qualquer uma das deleções que caracterizam os alelos de resistência resulta na amplificação de um fragmento de tamanho menor (< 208 pb) do que aqueles amplificados a partir de alelos que não possuem deleção. Inicialmente essa identificação é realizada por inspeção visual do perfil de fragmentos amplificados de cada larva, seguida da confirmação por meio de uma nova

reação de PCR, sequenciamento subsequente do DNA purificado da banda alvo para obtenção da identidade do fragmento.

Em nossa avaliação, um total de 2894 indivíduos foram submetidos a PCR, analisados em cinco momentos durante a intervenção. O momento 1 não foi analisado pois material estava sem condições de ser processado. A avaliação permitiu detectar a presença e determinar a frequência de alelos de resistência, em todos os momentos do estudo em ambas as áreas. No período de pré-intervenção a frequência foi de 0,057, sendo detectadas apenas heterozigotos para os alelos “*r*”. No período de intervenção a frequência variou entre 0,028 (A2 M3) a 0,13 (A2 M4) (Tabela 5). A comparação da frequência das duas áreas ao longo da intervenção mostrou que a frequência da A1 foi superior a A2 em três das quatro avaliações realizadas (M2= 0,086; M3=0,073 e M5=0,085) (Figura 15A). A avaliação global mostrou que A1 obteve uma frequência superior do alelo “*r*” (0,088) comparada a área 2 (0,069). Ambas as frequências globais encontradas durante a intervenção foram superiores ao período de pré-intervenção (0,057) (Figura 15B). A análise dos genótipos mostra que a maior frequência dos alelos “*r*” na área 1 deve-se principalmente aos alelos que são detectados em heterozigose (Figura 16). A frequência global de homozigotos para alelos “*r*” não diferiu entre as áreas ao longo da intervenção. A avaliação global dos genótipos mostra um cenário com 84-88% dos indivíduos caracterizados como homozigotos suscetíveis, 10-14% como heterozigotos e cerca de 2% homozigotos resistentes (Figura 16B).

O padrão de fragmentos amplificados correspondente aos alelos “*r*” confirmado através da repetição da PCR e a identidade pode ser analisada em amostras de fragmentos purificados e submetidos a sequenciamento. Dentre 385 indivíduos portadores de alelo “*r*” detectados com a presença do alelo, 98 amostras foram sequenciadas e confirmaram a presença de uma das deleções para o gene *cqm1*. O alelo *cqm1*<sub>REC</sub>, foi predominante, pois foi detectado em todas as amostras dos momentos analisados, ele representa 90,8% dos alelos identificados. Dois outros alelos descritos anteriormente foram detectados nas amostras e estes ocorrem em baixa frequência, sendo de 6,1% para *cqm1*<sub>REC-D16</sub>, e ainda mais rara 2,0% para *cqm1*<sub>REC-D25</sub>. Dentre as nove amostras analisadas, o *cqm1*<sub>REC-D16</sub> e o *cqm1*<sub>REC-D25</sub> foram detectados em apenas três e duas amostras respectivamente.

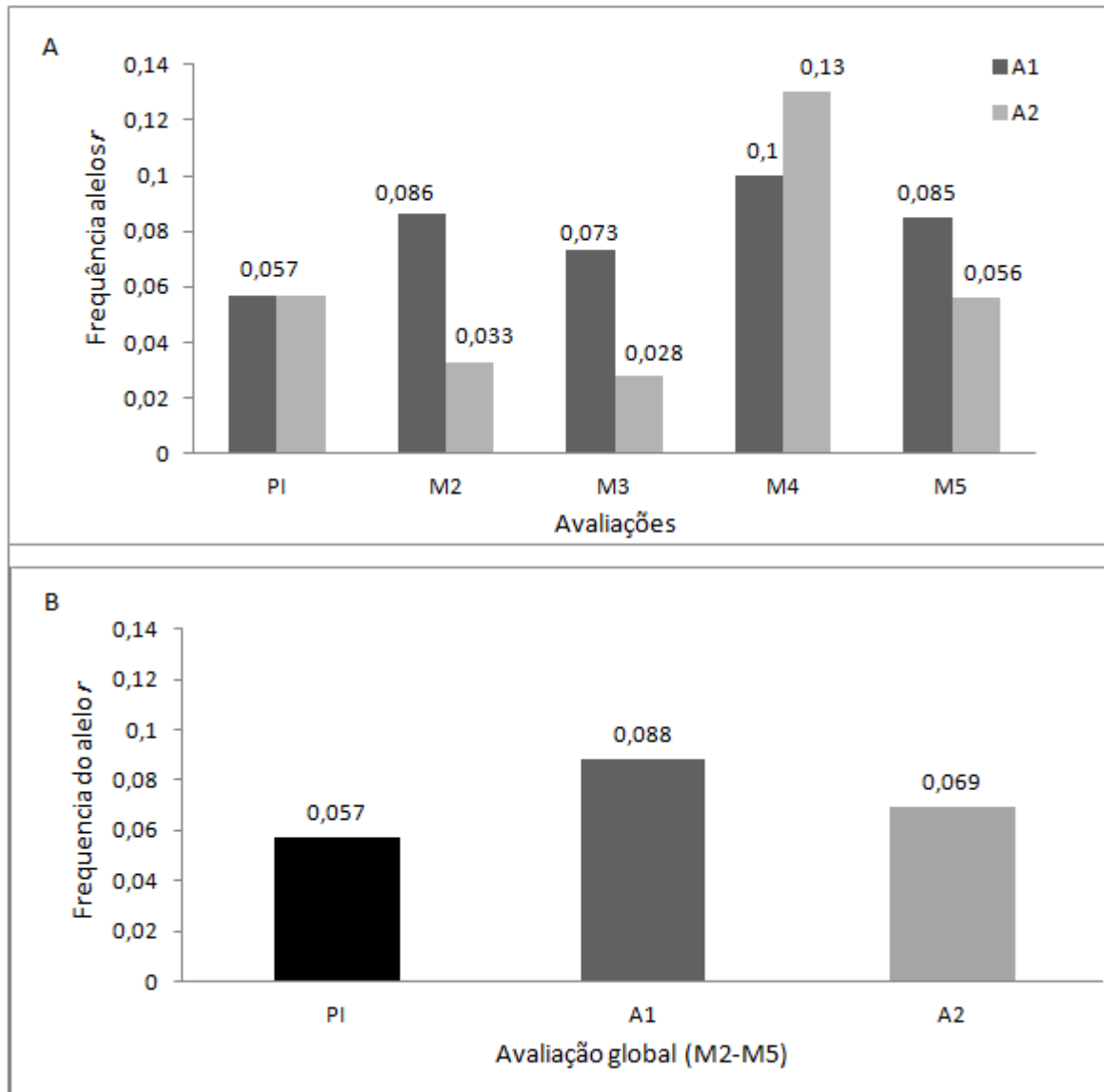
**Figura 14** - Separação eletroforética de fragmentos a partir de alelos do gene *cqm1* de *Culex quinquefasciatus* do bairro de Água-Fria, Recife-PE amplificados por PCR.



Fonte : A autora.

Nota: S-Suscetível, HT-Heterozigoto e R-Resistente. MM- marcador molecular em pares de bases.

**Figura 15-** Frequência dos alelos de resistência *cqm1*<sub>REC-D19</sub>, *cqm1*<sub>REC-D16</sub>, *cqm1*<sub>REC-D25</sub>, em larvas do 4º instar de *Culex quinquefasciatus* nas áreas 1 e 2 no bairro de Água Fria, Recife- PE, determinada através de reação de PCR alelo-específica.



Fonte: A autora

Nota: A) Avaliação no período de pré-intervenção e intervenção (M2-M5); B) Avaliação Global.

**Tabela 5-** Frequência de alelos de resistência do gene *cqm1* em larvas de *Culex quinquefasciatus* nas áreas 1 e 2 do bairro de água Fria, Recife-PE, coletados durante a pré-intervenção e durante cinco momentos de tratamento (M1-M5).

Tempo	Área	Nº de larvas	Genótipos (por PCR <sup>a</sup> )				F <sup>c</sup> alelos <i>r</i>	N	Identidade de alelos <i>r</i> (por sequenciamento <sup>b</sup> )					
			SS	SR	RR	<i>cqm1</i> <sub>REC-D19</sub>			<i>cqm1</i> <sub>REC-D16</sub>		<i>cqm1</i> <sub>REC-D25</sub>			
						SR			RR	SR	RR	SR	RR	
Pré-intervenção	1 e 2	515	458	55	2	0,057	2	2	0	0	0	0	0	0
M2	1	237	198	38	1	0,086	20	19	0	0	0	1	0	
	2	222	211	7	4	0,033	5	2	3	0	0	0	0	
M3	1	265	228	35	2	0,073	9	8	1	0	0	0	0	
	2	262	248	13	1	0,028	2	2	0	0	0	0	0	
M4	1	299	245	43	11	0,100	15	12	2	0	0	1	0	
	2	341	257	75	9	0,130	22	17	2	3	0	0	0	
M5	1	415	355	49	11	0,085	16	13	2	1	0	0	0	
	2	338	309	20	9	0,056	7	4	0	1	2	0	0	
Total		2894	2509	335	50	0,064	98	79	10	4	2	2	0	

Fonte: A autora

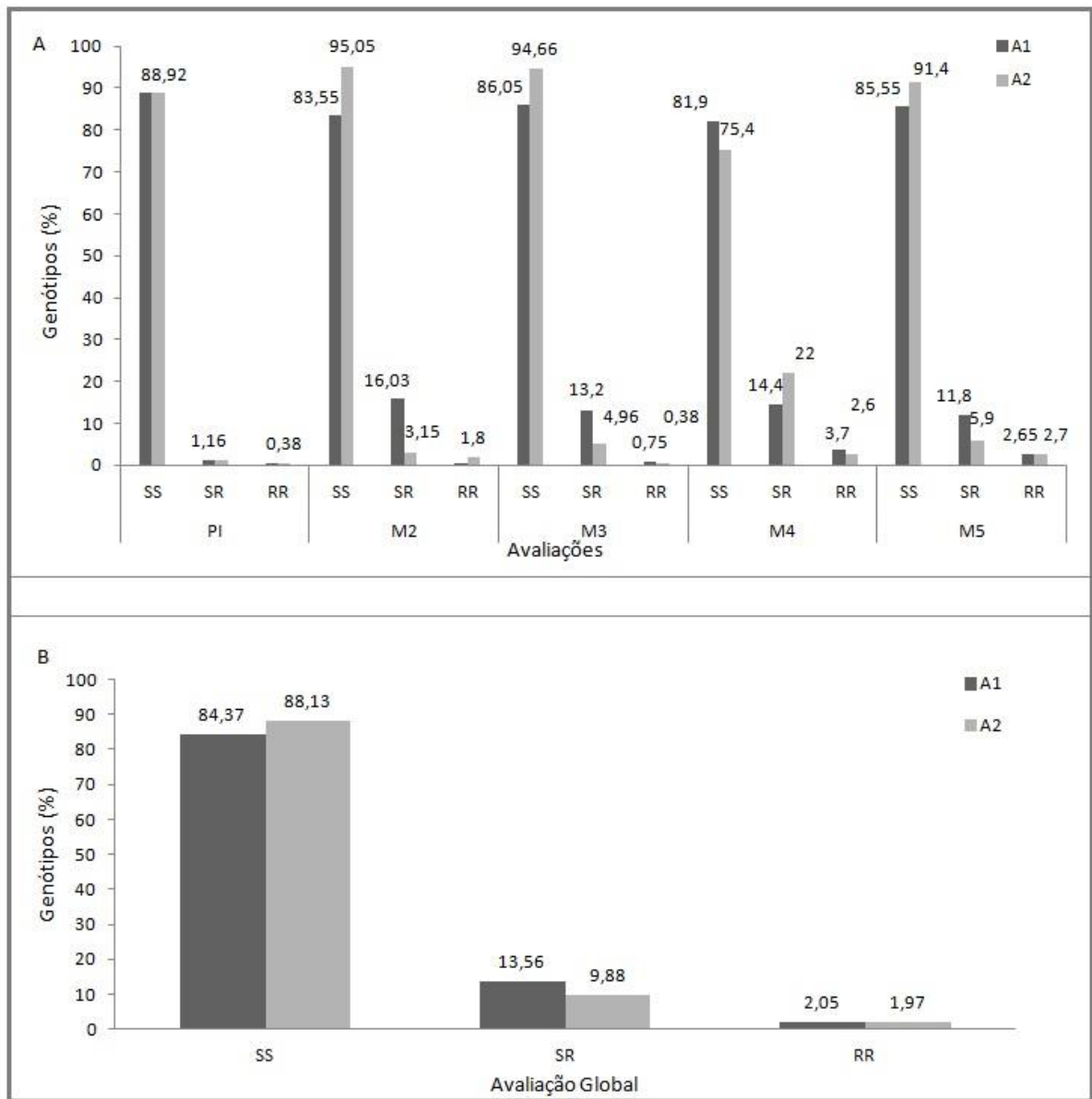
Nota:

<sup>a</sup>Detecção de alelos *cqm1* de acordo com padrão de fragmentos gênicos obtidos por PCR específica; <sup>b</sup>Identidade de fragmentos gênicos obtida por sequenciamento

<sup>c</sup>Frequência de fragmentos de alelos *r*, <sup>d</sup>Material não avaliado.



**Figura 16:** Percentuais de genótipos (%) para o gene *cqml* em larvas do 4º instar de *Culex quinquefasciatus* nas áreas 1 e 2 no bairro de Água Fria, Recife- PE, determinada através de reação de PCR alelo-específica. A) Avaliação no período de pré-intervenção e intervenção (M2-M5); B) Avaliação global.



Fonte: A autora.

### 8.6 Presença de *Aedes aegypti* em criadouros preferencialmente colonizados por *Culex quinquefasciatus*

A presença de formas pré-imaginais de *A. aegypti* foi investigada nas coletas em fossas nas coletas realizadas durante os três anos de intervenção. Foi possível detectar a presença dessa espécie em criadouros preferencialmente colonizados por *C. quinquefasciatus* em quatro coletas (Tabela 6), em ago/2012, set/2012, nov/2012, dez/2012. Um total de 139 indivíduos foi coletado, sendo 11 larvas e 128 pupas.

**Tabela 6** - Número de larvas e pupas de *Aedes aegypti* coletadas em criadouros preferencialmente colonizados por *Culex quinquefasciatus* em Água Fria, Recife-PE.

<b>Coleta</b>	<b>Área</b>	<b>Larva</b>	<b>Pupa</b>	<b>Total</b>
<b>Jun/2012</b>	A1	0	01	01
	A2	0	0	0
<b>Set /2012</b>	A1	08	85	93
	A2	03	10	13
<b>Out/2012</b>	A1	0	03	03
	A2	0	22	22
<b>Nov/2012</b>	A1	0	0	0
	A2	0	07	07
<b>Total</b>		11	128	139

Fonte: A autora.

## 9 DISCUSSÃO

### 9.1 Impacto no controle vetorial

A preocupação no Brasil e no mundo quanto ao risco de epidemias provocadas pelos vírus zika, dengue ou chikungunya justificam todo empenho na utilização de estratégias para o controle populacional de mosquitos vetores destes agentes. A região metropolitana do Recife, em particular, é ainda afetada pela filariose linfática (FL), causada pelo verme *W. bancrofti* e transmitida pelo vetor *Culex quinquefasciatus*, e constitui a única área endêmica para a FL remanescente no país. Dessa forma, a busca por estratégias mais eficazes para o controle de culicídeos vetores é um desafio para a saúde pública. Em nosso estudo, avaliamos um novo produto, constituído à base de cristais inseticidas de *Lysinibacillus sphaericus* (Lsp) e *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti), VectoMax<sup>®</sup> CG, como opção de agente larvicida para os mosquitos vetores *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* que proliferam, de forma abundante e concomitante em áreas urbanas. No bairro de Água Fria, duas áreas foram tratadas, na área 1 (A1) manteve-se a aplicação isolada de Lsp nos criadouros preferenciais de *C. quinquefasciatus* e o tratamento com Bti nos criadouros de *A. aegypti*. Na área 2 (A2) foi utilizado o produto conjugado VectoMax<sup>®</sup>. Nossos dados demonstram que o uso do VectoMax<sup>®</sup> na A2 está associado a uma redução adicional da população de *C. quinquefasciatus* que foi apontada pela densidade de adultos. Esta se manteve menor que no período de pré-tratamento (PI), apesar da frequente pressão de recolonização dos criadouros, que foi constatada pela presença de formas imaturas nas duas áreas de estudo durante toda avaliação.

A avaliação do impacto do tratamento nas densidades de adultos mostra uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) da população de *C. quinquefasciatus* em ambas as áreas avaliadas. Durante o primeiro ano de estudo, a substituição dos dois larvicidas biológicos pelo VectoMax<sup>®</sup>, na A2, revelou o melhor desempenho durante a intervenção, quando foi constatada uma redução de 61,9% na densidade de adultos de *C. quinquefasciatus* no primeiro ano comparada ao período de PI. Estudos realizados em diferentes bairros da RMR demonstraram que é possível alcançar uma redução significativa da densidade populacional desta espécie através do tratamento de criadouros com larvicidas bacterianos integrados a outros métodos de controle ambiental e ações de mobilização comunitária, visando também a eliminação do maior número de criadouros possíveis (REGIS et al., 1995, 1996; SILVA-FILHA et al., 2001). Para controle de *C. quinquefasciatus*, o mapeamento e tratamento de

todos os criadouros são fundamentais para atingir um alto nível de redução populacional, pois esta espécie apresenta um comportamento de oviposição que concentra muitos ovos em criadouros preferenciais identificados pelas fêmeas (CONSOLI, 1994). Mulla et al. (2001) utilizaram Lsp para controle de *C. quinquefasciatus* em criadouros de áreas urbanas na Tailândia, onde observaram redução de 80-98% na densidade dos mosquitos adultos. Ações de controle de vetores da malária no Kenia e Tanzânia utilizando Lsp e Bti, em rotatividade, também obtiveram sucesso na redução populacional de adultos de *Anopheles funestus*, *Anopheles gambiae* e *Anopheles coustani*, (FILLINGER; LINDSAY, 2006; TCHICAYA et al., 2010). Desta forma, o mapeamento preciso seguido de tratamento sistemático de criadouros com altas densidades nas áreas-alvo pode gerar excelentes resultados para o controle desta espécie.

Os dados de monitoramento de fossas em cada área nos períodos de PI e de intervenção não demonstraram uma redução na densidade de jangadas, larvas e pupas. Entretanto, durante o PI a densidade observada era relativamente baixa, pois as áreas já vinham sendo tratadas quando a intervenção como o VectoMax<sup>®</sup> foi iniciada na A2. Silva-Filha et al. (2001), trabalhando durante 26 meses de tratamento de criadouros de *C. quinquefasciatus*, ex. fossas, caixas de inspeção, poças de água servida e tanques com Lsp no bairro do Coque-Recife, encontraram DLPs de  $20,6 \pm 3,4$  e  $4,5 \pm 14,4$  na pós- intervenção, com valores semelhantes aos encontrados em nossas avaliações. Além disso, no nosso estudo o número de fossas monitoradas (5-10/área) pode ser considerado reduzido, devido às ações de controle ambiental realizadas pela Prefeitura do Recife. Algumas fossas foram reparadas e vedadas, não podendo assim, continuar sendo amostradas em nossa pesquisa. Diferentemente da coleta de imaturos, a amostragem de adultos foi feita em quinze casas por área, sendo mantido este número durante toda a avaliação. O índice de positividade da coleta dos adultos nas residências também reforça a sensibilidade desse indicador entomológico, pois a detecção da presença de *C. quinquefasciatus* através de larvas e pupas nos criadouros monitorados variou de 20 a 66.6%, enquanto a positividade de adultos nas residências foi entre 84 a 100%. Muitas vezes, registra-se a ausência de larvas em criadouros de uma residência, entretando no mesmo imóvel ou na sua circunvizinhança podem existir outros criadouros ativos. Isto reforça a vantagem da coleta de adultos ou do uso de armadilhas de oviposição, que são eficientes indicadores da presença de fêmeas reprodutivamente ativas no monitoramento da infestação por mosquitos em áreas urbanas (BARBOSA et al., 2007; REGIS et al., 2013; SANTOS et al., 2012).

Nosso estudo demonstrou que a amostragem dos mosquitos adultos foi mais robusta para avaliar o impacto da intervenção sobre a população de mosquitos, sendo considerado como um indicador relevante para programas de vigilância de *C. quinquefasciatus*.

Um dos objetivos do nosso trabalho foi investigar a presença de larvas de *A. aegypti* em fossas, criadouros preferencialmente colonizados por *C. quinquefasciatus*. O número de pupas coletado foi superior ao de larvas, possivelmente devido ao método de coleta (conchada), pois embora *A. aegypti* tenha grande deslocamento na coluna da água, diferente de larvas de *C. quinquefasciatus*, as pupas de *A. aegypti* nestes criadouros passam mais tempo na superfície. Assim como outros autores, constatamos que o mosquito *A. aegypti* pode colonizar concomitantemente com *C. quinquefasciatus* criadouros com elevada carga de matéria orgânica (BARRERA et al., 2008; SANTOS; BARBOSA, 2014). No bairro de Água Fria, a oviposição de *A. aegypti* nestes foi observada em diferentes momentos de coleta, em seis das dez fossas monitoradas. Nosso estudo demonstrou que *A. aegypti* pode depositar seus ovos em fossas, que as larvas eclodem e conseguem completar o ciclo de desenvolvimento em um ambiente aquático com elevado teor de matéria orgânica. Essa investigação foi realizada para conhecer a abrangência de criadouros utilizados pelo mosquito *A. aegypti*. Os resultados podem servir de subsídio para direcionar as ações de controle vetorial de *A. aegypti*, uma vez que o PNCD não contempla o tratamento de criadouros considerados habitats típicos de *C. quinquefasciatus*. A coabitação das duas espécies em fossas reforça a importância de um tratamento com Lsp-Bti em conjunto, pois amplia a cobertura larvicida contra *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*.

Em relação ao impacto do tratamento com os biolarvicidas sobre a densidade de *A. aegypti*, observou-se que a coleta de adultos através da aspiração resultou em um número reduzido de indivíduos. Por outro lado, a coleta de ovos através das ovitrampas revelou a presença de fêmeas reprodutivamente ativas dessa espécie nas residências, e um grande número de ovos foi removido do ambiente. A coleta de adultos de *A. aegypti* é considerada um desafio, pois, tanto através de aspirações quanto de armadilhas, o índice de coleta é geralmente baixo, variando de 1-2 adultos/coleta, enquanto o número de ovos coletados por ovitrampas em 30 dias pode ultrapassar 300 ovos/coleta. Foi observada uma redução significativa no número de ovos nos anos 2 e 3, em relação ao ano 1. Entretanto, não podemos atribuir essa redução ao uso dos biolarvicidas pelo fato de não haver dados relativos ao período de PI para comparações. Os resultados fornecidos pelos índices entomológicos utilizados nesse estudo para *A. aegypti* reforçam os achados de estudos prévios quanto à alta sensibilidade da ovitrampa, como ferramenta de monitoramento, em relação aos instrumentos

para coleta de adultos (RÍOS-VELASQUEZ et al., 2007; REGIS et al., 2008, 2013, 2014; SANTOS et al., 2003; SUTER et al., 2016).

Como descrito, o comportamento de oviposição de fêmeas de *C. quinquefasciatus* e de *A. aegypti* é distinto. *Culex quinquefasciatus* concentra sua postura em grupos de 150-300 ovos sob a forma de jangadas ovos (jangadas), e seus ovos liberam feromônios de agregação, que acabam exercendo também um papel de atração para oviposição de outras fêmeas da espécie (GANESAN et al., 2006). Por outro lado, fêmeas de *A. aegypti* possuem um comportamento definido como “oviposição em saltos” (*skip oviposition*), em que ovos de uma mesma postura serão depositados em inúmeros substratos úmidos disponíveis no ambiente gerando a estratégia de um padrão de dispersão. Desta forma, pode-se considerar que, operacionalmente, o controle vetorial baseado majoritariamente no uso de larvicidas é mais eficiente para o controle da densidade de *C. quinquefasciatus*. A possibilidade de identificar e localizar criadouros, onde estão concentrados elevados contingentes de imaturos no ambiente, permite alta cobertura e alcance de tratamento. Enquanto para *A. aegypti* é preciso identificar e tratar um número significativo de criadouros para alcançar um real controle de sua densidade populacional. Porém, muitos de seus criadouros não são facilmente localizados o que constitui um grande desafio, pois muitos deles inclusive microcriadouros, não são detectados pelos agentes de saúde ambiental, e podem ser responsáveis pela recolonização e manutenção do vetor na área. Desta forma, a utilização de diferentes estratégias de controle é a opção mais viável para controle de *A. aegypti*. Na literatura, alguns estudos já alertaram para a ineficiência de ações de controle de *Aedes* que utilizam apenas larvicidas como única estratégia para seu controle populacional, enfatizando assim, a importância de ações de controle integradas, que incluem o uso de armadilhas de oviposição, mobilização popular, divulgação das medidas de controle, dentre outros métodos (BARRERA et al., 2014; REGIS et al., 2013).

Considerando os resultados obtidos neste estudo, a utilização do produto VectoMax® para controle de vetores na A2 foi considerada vantajosa. Esse larvicida biológico é constituído pela combinação de protoxinas de cristais de Lsp e Bti que agem em sítios-alvos distintos. As toxinas de Bti interagem em sinergia com a toxina Bin de Lsp e potencializa a sua atividade contra as larvas ampliando seu espectro de ação. A utilização conjunta de cristais de Lsp e Bti restaura a toxicidade contra linhagens de *C. quinquefasciatus* resistentes a Lsp e é ativa para larvas de *A. aegypti*, que é uma espécie naturalmente refratária a Lsp por não possuir receptores para a toxina Bin (FERREIRA et al., 2010; THIERRY et al., 1998; WIRTH et al., 2000a; WIRTH et al., 2000b;). Assim, a mistura de cristais de Lsp + Bti pode reduzir o potencial de seleção de resistência a Lsp (CETIN et al., 2007; ZAHIRI et al., 2002).

O estudo revelou resultados satisfatórios quanto a utilização do VectoMax<sup>®</sup> CG nesse estudo, assim como em outras investigações, quanto ao controle de formas pré-imaginais de mosquitos (CETIM et al., 2005; ERITJA et al., 2013; GIRALDO-CALDERON et al., 2008; GUIDI et al., 2013). Anderson et al. (2011) observaram uma redução significativa no número de larvas e pupas de várias espécies (*Culex pipiens*, *Culex restuans* e *Aedes japonicus*) em criadouros de áreas urbanas (Straford, USA). Este produto também mostrou eficácia em outros cenários como o controle de *Culex tarsalis* em áreas silvestres alagadas “wetlands” (DRITZ et al., 2011). Esses estudos avaliaram áreas tratadas e não tratadas, fato que impede comparações diretas com os nossos dados, pois, antes da intervenção feita com VectoMax<sup>®</sup> CG a nossa área de estudo já estava sob tratamento com o Lsp, ou seja, nossa comparação aconteceu entre dois tipos de tratamento. O nosso estudo visou avaliar sobretudo, se o produto conjugado poderia substituir com sucesso o tratamento com os produtos a base de Lsp e Bti separadamente.

A aplicação do VectoMax<sup>®</sup> CG foi realizada bimensalmente nos criadouros, de acordo com o regime de tratamento larvicida dos programas governamentais. Entretanto, encontramos criadouros positivos para larvas durante o monitoramento mensal de fossas. Possivelmente, esse fato deve estar relacionado com o critério de aplicação de larvicidas, pois nem todos os criadouros monitorados foram tratados, o que influenciou negativamente nas ações de controle populacional de mosquitos na área. Estudos anteriores realizados em áreas urbanas de Recife com condições ambientais e entomológicas similares sugerem que melhores resultados podem ser alcançados aplicando larvicida em todos os criadouros reais e potenciais numa frequência mensal (REGIS et al., 1995). As características climáticas e ambientais encontradas em Recife (ex. alta insolação e pluviometria) são favoráveis à proliferação de mosquitos e desfavoráveis à persistência de larvicidas bacterianos. É importante ressaltar que cada esquema de tratamento deve ser estabelecido de acordo com as características ambientais, mosquitogênicas e logísticas locais. Regiões urbanas de grande parte dos municípios do Brasil necessitam de ações permanentes de controle de mosquitos vetores como *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* em razão da circulação de arbovírus e outros agentes etiológicos como *W. bancrofti* em Recife, por exemplo. Essa preocupação foi potencializada pela recente detecção de vírus zika em glândulas salivares de *C. quinquefasciatus* alimentadas artificialmente em laboratório com sangue infectado, pois sinalizou a possibilidade desta espécie poder transmitir o vírus (GUEDES et al., 2016).

## 9.2 Impacto na suscetibilidade de *C. quinquefasciatus* a Lsp e frequência de alelos 'r'

O monitoramento da suscetibilidade de *C. quinquefasciatus* a Lsp foi realizado através de ensaios biológicos de dose/resposta além de ferramentas moleculares para determinar a frequência de alelos de resistência a Lsp em amostras populacionais coletadas nas áreas de estudo. Através desse tipo de avaliação de suscetibilidade, é possível verificar se o tratamento está exercendo uma pressão de seleção na população de mosquitos exposta aos produtos a base de Lsp, isolado ou conjugado ao Bti. Nossos dados demonstram que apesar dos três anos de exposição aos larvicidas, não ocorreram variações significativas entre os valores de razões de resistência (RR<sub>50</sub> e RR<sub>90</sub>) das populações de *C. quinquefasciatus* das A1 e A2 comparada a colônia suscetível. Na A1, nos dois primeiros momentos de avaliação foram detectados valores de RR<sub>50</sub>, acima de 10 vezes, entretanto esses valores reduziram e não apresentaram um aumento no decorrer do estudo. Os dados mostram que, exceto em algumas observações isoladas como citado acima, os valores de RR foram em sua maioria inferiores a 10 em ambas as áreas de estudo. Silva-Filha et al. (2008) avaliando a mesma população encontrou valores de RR<sub>50</sub> entre 2,7 e 4,7 após períodos variáveis entre 13 e 21 tratamentos com Lsp, que não caracterizam resistência. Por outro lado, estudos prévios em outros países demonstram que populações de *C. quinquefasciatus* tratados com Lsp podem desenvolver níveis de resistência bastante elevados, com RR de 20.000 vezes ou superior, o que revela que as populações atingiram um estado de refratoriedade total a este biolarvicida (MULLA et al., 2003; NIELSEN-LEROUX-2002; RAO et al., 1995; SINÈGRE et al., 1994). De acordo com as avaliações de bioensaios, nossos dados demonstram que a população de *C. quinquefasciatus* de Água Fria não está sofrendo uma pressão de seleção suficiente para provocar alterações de RR avaliadas através de bioensaios.

Este método é o mais frequentemente empregado para avaliar a resistência de populações de mosquitos; entretanto, apresenta limitações, pois indivíduos heterozigotos para alelos de resistência a Lsp são suscetíveis e, portanto, o fenótipo de resistência não pode ser detectado. A identificação de indivíduos heterozigotos é possível através de ferramentas moleculares, uma vez que a identidade dos alelos seja conhecida, como neste modelo de estudo. Um *screening* dos alelos de resistência do gene *cqm1* em larvas das populações de *C. quinquefasciatus* das A1 e A2 foi realizado através de um método de PCR capaz de detectar fragmentos do gene em uma região alvo de deleções que estão associadas à resistência. Os alelos de resistência do gene *cqm1* avaliados neste estudo, provocam o mesmo efeito, ou seja, as deleções levam à formação de uma proteína truncada desprovida da âncora GPI, e



impedem a ligação da proteína Bin com o receptor (CHALEGRE et al., 2012, 2015; DARBOUX et al., 2002, 2007; GUO et al., 2013; ROMÃO et al., 2006), causando refratoriedade total. Portanto, o monitoramento da frequência desses alelos torna-se uma estratégia importante para o monitoramento da resistência. Durante a pré-intervenção, a frequência encontrada para esse alelos 0,057, foi semelhante ao encontrado por Chalegre et al. (2009) no mesmo bairro (0,053-0,055). A frequência alélica demonstrou uma variação entre as A1 e A2, sendo a A1 superior na maior parte dos momentos de avaliação (ao se avaliar globalmente, a frequência da A2 foi inferior a A1).

Em relação à análise de genótipos observados, especificamente em relação aos indivíduos homozigotos resistentes, observou-se que o número foi semelhante entre as áreas. Este resultado não foi esperado, pois o produto conjugado aplicado na A2 possui cristais de Lsp e de Bti, estes últimos poderiam eliminar um maior número de indivíduos homozigotos para os alelos “r”. Pois estes resistentes ao Lsp e suscetíveis ao Bti. Todavia, os dados demonstram que, assim como os dados de suscetibilidade (discutidos acima), a pressão de seleção não parece ter sido intensa durante o estudo, pois as frequências não se elevaram de forma significativa ao longo do tratamento, sobretudo na A1. Em estudos prévios em populações não tratadas com Lsp as frequências encontradas, são entre 0,003 e 0,006 (CHALEGRE et al., 2009), portanto são bem mais baixas que as frequências encontradas em nosso estudo em Água Fria ( $10^{-2}$ ). Os dados revelam que Água Fria apresenta uma linha de base (“default”) da frequência destes alelos maior do que áreas nunca tratadas com Lsp, o que é condizente com o histórico de tratamento da área com Lsp desde 2003 (SILVA-FILHA et al., 2008). Por outro lado, durante o presente estudo que corresponde a três anos de acompanhamento, não foi observado um aumento relevante e contínuo das frequências dos alelos em nenhuma das áreas, sugerindo que não estaria havendo forte pressão de seleção imposta pelo emprego dos biolarvicidas a base de Lsp na área do estudo. Ainda assim, os resultados de menor frequência dos alelos “r” na A2, na análise global e na maioria dos momentos analisados, sugerem que o produto conjugado desfavorece a seleção de tais alelos através da ação combinada seus cristais inseticidas. Estudos prévios revelaram que o gene *cqm1* possui diversos alelos de resistência identificados em populações de diferentes países (DARBOUX et al., 2002, 2007; GUO et al., 2013; ROMÃO et al., 2006), o que reintera a importância do monitoramento do uso de Lsp como larvicida para controle de mosquitos.

Em relação à diversidade, o atual estudo do bairro de Água Fria mostrou a presença de três alelos, *cqm1*<sub>REC-D19</sub>, *cqm1*<sub>REC-D16</sub> e *cqm1*<sub>REC-D25</sub>, sendo o último identificado pela primeira vez em nossas amostras de Água Fria em estudo publicado por Chalegre et al. (2012). Nossos

dados demonstraram que o alelo mais frequente, baseado nos resultados das amostras sequenciadas, foi o *cqm1<sub>REC</sub>*. Estes resultados, juntamente com dados prévios (CHALEGRE et al., 2009, 2012; MENEZES et al., 2016) indicam que os alelos *cqm1<sub>REC-D16</sub>* e *cqm1<sub>REC-D25</sub>*, assim como o alelo *cqm1<sub>REC-2</sub>*, que não foi avaliado neste estudo, têm uma frequência e distribuição muito menor do que o *cqm1<sub>REC</sub>* (MENEZES et al., 2016). Os alelos *cqm1<sub>REC-D16</sub>* e *cqm1<sub>REC-D25</sub>* foram encontrados apenas de maneira pontual na população avaliada em ambas as áreas de estudo. Assim, os resultados deste estudo demonstram que monitoramento do alelo *cqm1<sub>REC</sub>* é o mais importante e pode ser usado como marcador da pressão de seleção de resistência a Lsp. Esta ferramenta pode ter um poder de resolução muito superior aos bioensaios, sobretudo para alelos com modo de herança recessivo, e vários trabalhos têm reforçado a importância da caracterização destes alelos, pois assim é possível aplicar métodos diretos para seu monitoramento dos alelos “*r*” em populações de insetos tratados (XU et al., 2009; ZHANG et al., 2012).

Os resultados produzidos por este estudo mostram que a utilização do larvicida conjugado à base de Lsp e Bti em criadouros urbanos apresenta vantagens, pois foi possível reduzir o tamanho populacional de *C. quinquefasciatus*. Além disso, a presença de um complexo de cristais tóxicos pode ter atuado na prevenção da seleção de alelos de resistência do gene *cqm1* em populações de *C. quinquefasciatus*.

Nossas avaliações quanto a operacionalidade da aplicação do produto nós observamos que foi utilizado 5 vezes menos larvicida que a área 1, gerando um ganho operacional no transporte e aplicação do produto nos criadouros pelos agentes de saúde ambiental. Quando ao impacto na população de mosquitos, verificamos que enquanto existiu uma colaboração entre nosso laboratório de pesquisa e a secretaria de saúde do município foi possível constatar um real impacto na densidade de *C. quinquefasciatus*, durante os primeiros 12 ciclos de acompanhamento. Após esse período não mais detectamos esse efeito na área tratada como o Vectomax. Dessa forma, ressaltamos que o acompanhamento da atividade larvicida em campo através da densidade de larvas, pupas e adultos, suscetibilidade larval e frequência alélica de genes de resistência. Dessa forma é possível realizar o aperfeiçoamento dos programas de controle de mosquitos, e conseqüentemente, a redução de transmissão de patógenos nas áreas alvo de tais intervenções.

O controle populacional de *A. aegypti* continua sendo um grande desafio, pois suas características eco-biológicas limitam estratégias de controle que se baseiem apenas em um único tipo de intervenção, como a aplicação de larvicidas. Assim, reforçamos a importância de

ações integradas de controle com a utilização de armadilhas, aspiradores, além do envolvimento da população no combate aos mosquitos.

## 10 CONCLUSÕES

- a) O produto VectoMax<sup>®</sup> é eficaz para substituir o uso de produtos individualizados à base de Lsp e Bti, pois reduz a densidade populacional de *C. quinquefasciatus*. Não foi alcançado um impacto significativo sobre a população de *A. aegypti*, independente do esquema de biolarvicidas utilizados, apontando que o alcance de larvicidas em geral sobre esta espécie é limitado.
- b) Em áreas caracterizadas pela forte pressão de colonização das espécies estudadas, as aplicações de larvicidas devem ser mensais em todos os criadouros existentes, independentemente da qualidade da água e presença de formas pré-imaginais.
- c) O mosquito *A. aegypti* é capaz de concluir seu ciclo pré-imaginal em criadouros ricos em matéria orgânica, naturalmente colonizados por *C. quinquefasciatus*.
- d) A utilização de larvicidas à base de Lsp nas duas áreas não exerce seleção suficiente para produzir razões de resistência significativas e ascendentes ao longo do tratamento. No entanto, o monitoramento molecular de alelos de “*r*” do gene *cqm1* sugere que o uso do VectoMax<sup>®</sup> pode ter desfavorecido a seleção destes alelos.
- e) O screening apontou ainda que, dentre os três alelos “*r*” detectados, o *cqm1<sub>REC-D19</sub>* é o mais adequado como marcador da pressão de seleção.
- f) A utilização do produto conjugado Lsp+Bti ofereceu vantagens, pois reduziu a densidade de *C. quinquefasciatus*, com um menor potencial de seleção de resistência, além das vantagens logísticas oferecidas pelo uso de um único produto em campo.

## REFERÊNCIAS

AHMED, I. et al. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Cambridge, v. 57, n. 5, p. 1117-1125, maio 2007.

ALBUQUERQUE, M. F. P. M. Urbanização, favelas e endemias: A produção da filariose no Recife, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 9, n. 4, p. 487-497, out./dez. 1993.

AMORIM, L. B. et al. Development of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* strain IAB59 needs long term selection pressure. Biological Control, San Diego, v. 42, n. 2, p. 155-160, ago. 2007.

AMORIM, L. B. et al. Susceptibility status of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) populations to the chemical insecticide temephos in Pernambuco, Brazil. Pest Management Science, West Sussex, v. 69, n. 12, p. 1307-1314, abr. 2013.

ANASTAS, P.; KIRCHCHOFF, M.; WILLIAMSON, T. Spinosad-a new natural product for insect control. Green Chemistry, London, v. 1, n. 4, p. G88-G88, 1999.

ANDERSON, J. F. et al. Control of mosquitoes in catch basins in Connecticut with *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Bacillus sphaericus*, and spinosad. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 27, n. 1, p. 45-55, mar. 2011.

ANDRADE, C. F.; NASCIMENTO, M. C. Controle de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) pela eliminação de criadouros no bairro da Graúna, Paraty – RJ. Revista Controle Biológico, São Paulo, v. 2, p.33-39, jan. 2010.

ARAÚJO, A. P. et al. The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. Parasites & Vectors, London, v. 6, n. 1, p. 297, out. 2013.

AZIZ, A. T. et al. Insecticide susceptibility of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Makkah City, Saudi Arabia. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, Haikou, v.1, p. 94-99, jun. 2001.

BARBOSA, R. M. R. et al. Laboratory and field evaluation of an oviposition trap for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 102, n. 4, p. 523-529, jun. 2007.

BARKER, C. M. et al. Relationship between distance from major larval habitats and abundance of adult mosquitoes in semiarid plains landscapes in Colorado. Journal of Medical Entomology, Oxford, v. 46, n. 6, p. 1290-1298, nov. 2009.

BARRERA, R. et al. Unusual productivity of *Aedes aegypti* in septic tanks and its implications for dengue control. Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v. 22, n. 1, p. 62-69, mar. 2008.

BARRERA, R. et al. Sustained, area-wide control of *Aedes aegypti* using CDC autocidal gravid ovitraps. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 91, n. 6, p. 1269-1276, set. 2014.

BAUMANN, P. et al. Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. Journal of Bacteriology, Washington v. 163, n. 2, p. 738-747, ago. 1985.

BAUMANN, L.; BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. Sequence analysis of the mosquitoicidal toxin genes encoding 51.4-and 41.9-kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. Journal of Bacteriology, Washington, v. 170, n. 5, p. 2045-2050, may. 1988.

BECKER, N. Microbial control of mosquitoes: management of the Upper Rhine mosquito population as a model programme. Parasitology Today, Amsterdam, v. 13, n. 12, p. 485-487, dec. 1997.

BECKER, N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: J.F. Charles, J.F. et al. (eds.). Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application. Dordrecht: Springer Netherlands, 2000. p. 383-398.

BECKER, N. Ice granules containing endotoxins of microbial agents for the control of mosquito larvae-a new application technique. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 19, n. 1, p. 63-66, mar. 2003.

BECKER, N. Ice granules containing endotoxins of microbial agents for the control of mosquito larvae-a new application technique. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 19, n. 1, p. 63-66, mar. 2003.

BECKER, N.; LUDWIG, M. Investigations on possible resistance in *Aedes vexans* field populations after a 10-year application of *Bacillus thuringiensis israelensis*. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 9, n. 2, p. 221-224, jun. 1993.

BEN-DOV, E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. Toxins, Basel, v. 6, n. 4, p. 1222-1243, mar. 2014.

BERRY, C. et al. Genetic determinants of host ranges of *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal toxins. Journal of Bacteriology, Washington v. 175, n. 2, p. 510-518, jan. 1993.

BERRY, Colin et al. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Applied and Environmental Microbiology, v. 68, n. 10, p. 5082-5095, oct. 2002.

BERRY, Colin. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. Journal of Invertebrate Pathology, New York, v. 109, n. 1, p. 1-10, jan. 2012.

BEZERRA, E. et al. Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. Neotropical Entomology, Rio de Janeiro, v. 35, p. 853-860, nov./dec. 2006.

BOONSERM, P. et al. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. Journal of Bacteriology, Washington, v. 188, n. 9, p. 3391-3401, may 2006.

BOYCE, R. et al. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. Tropical Medicine & International Health, Malden, v. 18, n. 5, p. 564-577, mar. 2013.

BOYER, S. et al. Influence of insecticide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* treatments on resistance and enzyme activities in *Aedes rusticus* larvae (Diptera: Culicidae). Biological Control, San Diego, v. 62, n. 2, p. 75-81, aug. 2012.

BRAGA, I. A. et al. Comparação entre pesquisa larvária e armadilha de oviposição, para detecção de *Aedes aegypti*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical, Rio de Janeiro, v.33, n.4, p. 347-353, jul./ago. 2000.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. Epidemiologia e Serviços de Saúde Brasília, Brasília, v. 16, n. 4, p. 295-302, dec. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Blog da saúde Brasil avança na produção de vacina contra a dengue. Brasília, DF, 10 ago. 2015. Disponível em: <<http://www.blog.saude.gov.br/entenda-o-sus/50072-brasil-avanca-na-producao-de-vacina-contr-a-dengue>>. Acesso em: 22 jan. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica: febre amarela. Brasília, DF, 5 jan. 2017. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-febre-amarela>>. Acesso em: 12 jan. 2017.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon, Glasgow, v. 49, n. 4, p. 423-435, nov. 2007.

BUTKO, P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 69, n. 5, p. 2415-2422, may. 2003.

CADENA, B.; MULLEN, N. D.; Gary, R. Field comparison of Bermuda-hay infusion to infusions of emergent aquatic vegetation for collecting female mosquitoes. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 23, n. 2, p. 117-123, jun. 2007.

CALVET, G. A.; DOS SANTOS, F. B.; SEQUEIRA, P. C. Zika virus infection: epidemiology, clinical manifestations and diagnosis. Current Opinion in Infectious Diseases, Washington, v. 29, n. 5, p. 459-466, out. 2016.

CAMPOS, G. S. et al. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. Emerging Infectious Diseases Journal, Atlanta, v. 21, n. 10, p. 1885-6, out. 2015.

CANTÓN, P. E. et al. Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. Peptides, Oulu, v. 32, n. 3, p. 595-600, mar. 2011.

- CETIN, H.; DECHANT, P.; YANIKOGLU, A. Field trials with tank mixtures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against *Culex pipiens* larvae in septic tanks in Antalya, Turkey. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 23, n. 2, p. 161-165, jun. 2007.
- CETIN, H. et al. Operational evaluation of Vectomax® WSP (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* + *Bacillus sphaericus*) against larval *Culex pipiens* in septic tanks 1. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 31, n. 2, p. 193-195, jun. 2015.
- CETIN, H.; YANIKOGLU, A.; CILEK, J. E. Evaluation of the naturally-derived insecticide spinosad against *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) larvae in septic tank water in Antalya, Turkey. Journal of Vector Ecology, Santa Ana, v. 30, n. 1, p. 151, jun. 2005.
- CHADEE, D.D.; CORBET, P. S. The gonotrophic status and diel pattern of entry to outdoor oviposition sites of female *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Annals of Tropical Medicine and Parasitology, Philadelphia, v.87, n. 3, p. 263-268, jun. 1993.
- CHALEGRE, K. D. et al. Detection of an allele conferring resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex quinquefasciatus* populations by molecular screening. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 75, n. 4, p. 1044-1049, feb. 2009.
- CHALEGRE, K. D. et al. Novel mutations associated with resistance to *Bacillus sphaericus* in a polymorphic region of the *Culex quinquefasciatus* cqm1 gene. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 78, n. 17, p. 6321-6326, sep. 2012.
- CHALEGRE, K. D. et al. Co-selection and replacement of resistance alleles to *Lysinibacillus sphaericus* in a *Culex quinquefasciatus* colony. FEBS journal, Bethesda, v.282, n. 18, p. 3592-3602, sep. 2015
- CHARLES, J. F. Ultrastructural midgut events in Culicidae larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spore/ crystal complex. Annales de l'Institut Pasteur/ Microbiologie, Paris, v. 138, n. 4, p. 471-484, jul/ago. 1987.
- CHARLES, J. F. et al. 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 Microbiology Letters, Oxford, v. 156, n. 1, p. 153-159, jan. 1997.
- CHEN, J. et al. *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Biochemical Journal, London, v. 424, n. 2, p. 191-200, nov. 2009a.
- CHEN, J. et al. Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Ceske Budejovice, v. 39, n. 10, p. 688-696, oct. 2009b.
- CIOTA, A. T. et al. The effect of temperature on life history traits of *Culex* mosquitoes. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 51, n. 1, p. 55-62, jun. 2014.



- CLEMENTS, A. N. The Biology of Mosquitoes: development, nutrition and reproduction. 2 ed. London: Chapman & Hall, 1996. v. 1, 509p.
- COHEN, E. Chitin biochemistry: synthesis and inhibition. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 32, n. 1, p. 71-93, jan. 1987.
- CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 1. ed. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1994. 228p.
- CONSOLI, R.A. et al. Efficacy of a new formulation of *Bacillus sphaericus* 2362 against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Montes Claros, Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 92, p.571-573, Jul./Ago.1997.
- COSTA, F. S. et al. Dinâmica populacional de *Aedes aegypti* (L) em área urbana de alta incidência de dengue. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 41, n. 3, p. 309-12, maio/jun. 2008.
- CRICKMORE, N. et al. Contribution of the individual components of the  $\delta$ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. FEMS Microbiology Letters, Oxford, v. 131, n. 3, p. 249-254, sep. 1995.
- CRINNION, W. J. Environmental Medicine, Part 4: Pesticides – Biologically Persistent and Ubiquitous Toxins. Alternative Medicine Review, Saindpoint, v. 5, p. 432- 447, oct. 2000.
- DARBOUX, I. et al. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Ceske Budejovice, v. 31, n. 10, p. 981-990, sep. 2001.
- DARBOUX, I. et al. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 99, n. 9, p. 5830-5835, apr. 2002.
- DARBOUX, I. et al. Transposon mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field evolved population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Cellular Microbiology, Malden, v. 9, n. 8, p. 2022-2029, aug. 2007.
- DAVIDSON, E. W. et al. Enzymatic activation of the *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal toxin. Journal of Invertebrate Pathology, New York, v. 50, n. 1, p. 40-44, jul. 1987.
- DAVIES, T. G. E. et al. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. IUBMB life, Malden, v. 59, n. 3, p. 151-162, mar. 2007.
- DE BARJAC, H. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for larvae of *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles, Paris, v. 286, n. 15, p. 1175-1178, apr. 1978.
- DE MAAG, R. A. et al. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. Annual Review of Genetics, Palo Alto, v. 37, n. 1, p. 409-433, dec. 2003.

DE MELO, J. V. et al. Cytopathological effects of *Bacillus sphaericus* Cry48Aa/Cry49Aa toxin on binary toxin-susceptible and-resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 75, n. 14, p. 4782-4789, jul. 2009.

DE MELO, J. V. et al. Ultrastructural analysis of midgut cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*. Micron, New York, v. 39, n. 8, p. 1342-1350, dec. 2008.

DECHKLAR, M et al. Functional expression in insect cells of glycosylphosphatidylinositol-linked alkaline phosphatase from *Aedes aegypti* larval midgut: a *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptor. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Ceske Budejovice, v. 41, n. 3, p. 159-166, mar. 2011.

DIAZ, L. A. et al. Transmission of endemic St Louis encephalitis virus strains by local *Culex quinquefasciatus* populations in Cordoba, Argentina. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 107, n. 5, p. 332-334, mar. 2013.

DRITZ, D. A. et al. Control of mosquito larvae in seasonal wetlands on a wildlife refuge using Vectomax™ CG. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 27, n. 4, p. 398-403, dec. 2011.

EISLER, R. Diffubenzuron hazards to fish, wildlife, and Invertebrates: A synoptic review. Laurel: U. S. Fish and Wildlife Service - Patuxent Wildlife Research Center, 1992. 48p.

ELDEFRAWI, M. E. et al. Interactions of pyrethroid and cyclodiene insecticides with nicotinic acetylcholine and GABA receptors. Neurotoxicology, Little Rock, v. 6, n. 2, p. 47-62, summer. 1985.

ELLIOTT, M. The relationship between the structure and the activity of pyrethroids. Bulletin of the World Health Organization, Switzerland, v. 44, n. 1/3, p. 313, 1971.

ERITJA, R. Laboratory tests on the efficacy of VBC60035, a combined larvicidal formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis* (strain AM65-52) and *Bacillus sphaericus* (strain 2362) against *Aedes albopictus* in simulated catch basins. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 29, n. 3, p. 280-283, sep. 2013.

FADER, J. E.; JULIANO, S. A. Oviposition habitat selection by container dwelling mosquitoes: responses to cues of larval and detritus abundances in the field. Ecological Entomology, London, v. 39, n. 2, p. 245-252, mar. 2014.

FAY, R. W. et al. Laboratory Studies of Ovipositional Preferences of *Aedes aegypti*. Mosquito News, New York, v. 25, n. 3, p. 276-81, 1965.

FEDERICI, B. A. et al. Developing recombinant bacteria for control of mosquito larvae. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 23, n. sp2, p. 164-175, jul. 2007.

FEDERICI, B. A.; PARK, H. W.; BIDESHI, D. K. Overview of the basic biology of *Bacillus thuringiensis* with emphasis on genetic engineering of bacterial larvicides for mosquito control. Open Toxinology Journal, Hilversum, v. 3, n. 2, p. 83-100, 2010.

FERNÁNDEZ, L. E. et al. Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop  $\alpha 8$  of domain II. FEBS Letters, Amsterdam, v. 579, n. 17, p. 3508-3514, jun. 2005.

FERNANDEZ-LUNA, M. T. et al. An  $\alpha$ -amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). Environmental Microbiology, Oxford, v. 12, n. 3, p. 746-757, dec. 2010.

FERREIRA, L. M. et al. The orthologue to the Cpm1/Cqm1 receptor in *Aedes aegypti* is expressed as a midgut GPI-anchored  $\alpha$ -glucosidase, which does not bind to the insecticidal binary toxin. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Ceske Budejovice, v. 40, n. 8, p. 604-610, aug. 2010.

FERREIRA, L. M. et al. Non conserved residues between Cqm1 and Aam1 mosquito  $\alpha$ -glucosidases are critical for the capacity of Cqm1 to bind the Binary toxin from *Lysinibacillus sphaericus*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 50, p. 34-42, jul. 2014.

FERREIRA, L. M.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Bacterial larvicides for vector control: Mode of action of toxins and implications for resistance. Biocontrol Science and Technology, Abingdon, v. 23, n. 10, p. 1137-1168, jul. 2013.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 40, n. 2, p. 224-229, mar./apr. 2007.

FILLINGER, U.; LINDSAY, S. W. Suppression of exposure to malaria vectors by an order of magnitude using microbial larvicides in rural Kenya. Tropical Medicine & International Health, Malden, v. 11, n. 11, p. 1629-1642, sep. 2006.

FINNEY, D. K. Probit Analysis – A Statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve. 3<sup>rd</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. 333p.

FONTES, G. et al. Lymphatic filariasis in Brazil: epidemiological situation and outlook for elimination. Parasites & Vectors, Londres, v. 5, n. 1, p. 272, nov. 2012.

FORATTINI, O. P. Culicidologia Médica. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo, 2002. 860p.

FOSTER, W. A., WALKER, E. D., Mosquitoes (Culicidae). In: MULLEN, G.R.; DURDEN, L.A. Medical and Veterinary Entomology. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2009. p. 201–253.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Guia de vigilância epidemiológica. Brasília, DF, 2002. 842p.

GANESAN, K. et al. Studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) ovipositional responses to newly identified semiochemicals from conspecific eggs. Australian Journal of Entomology, Canberra, v. 45, n. 1, p. 75-80, feb. 2006.

GEORGHIOU, G. P.; WIRTH, M. C. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 63, n. 3, p. 1095-1101, mar. 1997.

GIRALDO-CALDERÓN, G. I. et al. Evaluation of the triflumuron and the mixture of *Bacillus thuringiensis* plus *Bacillus sphaericus* for control of the immature stages of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in catch basins. Biomedica, Envidado, v. 28, n. 2, p. 224-233, apr./jun. 2008.

GOLDBERG, L. J.; MARGALIT. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosquitoes News, New York, v. 37, n. 3, p. 355-358, sep. 1977.

GOMES, A. S.; SCIAVICO, C. J.; EIRAS, A. E. Periodicity of oviposition of females of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) in laboratory and field. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 327-332, jul./ago. 2006.

GORDON, R.; BURFORD, I. R. Effects of methoprene, a juvenile hormone analogue, on the larval and pupal stages of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Journal of Insect Physiology, London, v. 30, n. 4, p. 279-286, jan. 1984.

GRAF, J. F. The role of insect growth regulators in arthropod control. Parasitology Today, Amsterdam, v. 9, n. 12, p. 471-474, dec. 1993.

GROSSCURT, A. C. et al. PH 70-23: A new acaricide and insecticide interfering with chitin deposition. Pesticide Science, Heidelberg, v. 22, n. 1, p. 51-59, 1988.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. Trends in Microbiology, Cambridge, v. 10, n. 2, p. 100-103, jan. 2002.

GUEDES, D.R et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. BioRxiv, Nova York, set. 2016. Disponível em <<http://www.biorxiv.org/content/early/2016/09/02/073197.full.pdf+html>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

GUERCHICOFF, Alejandra; UGALDE, Rodolfo A.; RUBINSTEIN, Clara P. Identification and characterization of a previously undescribed cyt gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Applied and Environmental Microbiology, Oxford, v. 63, n. 7, p. 2716-2721, jul. 1997.

GUIDI, V. et al. Dynamics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Lysinibacillus sphaericus* spores in urban catch basins after simultaneous application against mosquito larvae. PloS One, San Francisco, v. 8, n. 2, p. e55658, feb. 2013.

GUILLET, P. et al. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* for onchocerciasis control in West Africa. In: \_\_\_\_\_. Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies. Springer Netherlands: Springer, 1990. p. 187-201.

GUO, Q. et al. Single nucleotide deletion of *cqm1* gene results in the development of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus*. Journal of Insect Physiology, London, v. 59, n. 9, p. 967-973, 2013.

GYAWALI, N.; BRADBURY, R. S.; TAYLOR-ROBINSON, A. W. The global spread of Zika virus: is public and media concern justified in regions currently unaffected? Infectious Diseases of Poverty, London, v. 5, n. 1, p. 37, apr. 2016.

HALSTEAD, S. B. Dengue virus–mosquito interactions. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 53, p. 273-291, jan. 2008.

HARBISON, J. E.; METZGER, M. E.; HU, R. Association between *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) oviposition and structural features of belowground stormwater treatment devices. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 47, n. 1, p. 67-73, sep. 2010.

HARRINGTON, L. C.; EDMAN, J. D.; SCOTT, T. W. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 38, n. 3, p. 411-422, jan. 2001.

HAZIN, A. N. et al. Computed tomographic findings in microcephaly associated with Zika virus. New England Journal of Medicine, Waltham, v. 374, n. 22, p. 2193-2195, jun. 2016.

HEMINGWAY, J. et al. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Ceske Budejovice, v. 34, n. 7, p. 653-665, jul. 2004.

HEUKELBACH, J.; WERNECK, G. L. Surveillance of Zika virus infection and microcephaly in Brazil. The Lancet, Amsterdam, v. 388, n. 10047, p. 846-847, jun. 2016.

HONÓRIO, N. A. et al. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 98, n. 2, p. 191-198, mar. 2003.

HUA, G. et al. *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. Biochemistry, Philadelphia, v. 47, n. 18, p. 5101-5110, may. 2008.

JONES, G. W. et al. A new Cry toxin with a unique two-component dependency from *Bacillus sphaericus*. The FASEB Journal, Bethesda, v. 21, n. 14, p. 4112-4120, jul. 2007.

JONES, G. W. et al. The Cry48Aa-Cry49Aa binary toxin from *Bacillus sphaericus* exhibits highly restricted target specificity. Environmental Microbiology, Oxford, v. 10, n. 9, p. 2418-2424, 2008.

JURAT-FUENTES, J. L.; ADANG, M. J. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. The FEBS Journal, Bethesda, v. 271, n. 15, p. 3127-3135, jul. 2004.

KAHINDI, S. C. et al. Efficacy of vectobac DT and culinexcombi against mosquito larvae in unused swimming pools in Malindi, Kenya. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 24, n. 4, p. 538-542, dec. 2008.

KAMGANG, B. et al. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. Parasites & Vectors, Londres, v. 4, n. 1, p. 79, may. 2011.

KEARNEY, M. et al. Integrating biophysical models and evolutionary theory to predict climatic impacts on species' ranges: the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Australia. Functional Ecology, Oxford, v. 23, n. 3, p. 528-538, jan. 2009.

KELLEN, W. R. et al. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology, New York, v. 7, n. 4, p. 442-448, dec. 1965.

KNIGHT, P. J. K.; CRICKMORE, N.; ELLAR, D. J. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA (c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. Molecular Microbiology, Washington v. 11, n. 3, p. 429-436, feb. 1994.

KNOWLES, B. H.; ELLAR, D. J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with different insect specificity. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, Amsterdam, v. 924, n. 3, p. 509-518, jun. 1987.

KONI, P. A.; ELLAR, D. J. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic  $\delta$ -endotoxins. Microbiology, Cambridge, v. 140, n. 8, p. 1869-1880, aug. 1994.

KRAMER, L. D.; STYER, L. M.; EBEL, G. D. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 53, p. 61-81, jan. 2008.

LACEY, L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 23, n. 2, p. 133-163, jul. 2007.

LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. Journal of Invertebrate Pathology, New York, v. 132, p. 1-41, nov. 2015.

LACEY, L. A.; LACEY C. M.; PADUA, L. E. Host range and some other factors influencing the mosquito larvicidal activity of the PG-14 isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *morrisoni*. Journal America Mosquito Control Association, Fresno, v. 4, p. 39-43, 1988.

LEISNHAM, P. T.; LADEAU, S. L.; JULIANO, S. A. Spatial and temporal habitat segregation of mosquitoes in urban Florida. PLoS One, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e91655, mar. 2014.

LIKITVIVATANAVONG, S. et al. Multiple receptors as targets of Cry toxins in mosquitoes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Whashington, v. 59, n. 7, p. 2829-2838, 2011.

LUJAN, D. A. et al. Evaluation of seasonal feeding patterns of West Nile virus vectors in Bernalillo County, New Mexico, United States: implications for disease transmission. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 51, n. 1, p. 264-268, nov. 2014.

MACIEL-DE-FREITAS, R. et al. Variation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) container productivity in a slum and a suburban district of Rio de Janeiro during dry and wet seasons. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 102, n. 4, p. 489-496, 2007.

MACIEL-DE-FREITAS, R. et al. Undesirable consequences of insecticide resistance following *Aedes aegypti* control activities due to a dengue outbreak. PLoS One, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e92424, mar. 2014.

MARCOMBE, S. et al. Field efficacy of new larvicide products for control of multi-resistant *Aedes aegypti* populations in Martinique (French West Indies). The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 84, n. 1, p. 118-126, ago. 2011.

MARQUES, C. C. A.; MIRANDA, C. Influence of larval, pupal and eggs extracts on the oviposition behavior of *Aedes (s) albopictus* (Skuse). Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 269-271, ago. 1992.

MAYES, M. A. et al. Spinosad toxicity to pollinators and associated risk. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Springer, New York, p. 37-71, 2003.

MENEZES, H. S. G. et al. A new allele conferring resistance to *Lysinibacillus sphaericus* is detected in low frequency in *Culex quinquefasciatus* field populations. Parasites & Vectors, Londres, v. 9, n. 1, p. 70, fev. 2016.

MILLAR, J. G. et al. Interaction of the *Culex quinquefasciatus* egg raft pheromone with a natural chemical associated with oviposition sites. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 10, n. 3, p. 374-379, sep. 1994.

MLAKAR, J. et al. Zika virus associated with microcephaly. The New England Journal Medical, London, v. 2016, n. 374, p. 951-958, mar. 2016.

MONDAL, K.; PARWEEN, S. Insect growth regulators and their potential in the management of stored-product insect pests. Integrated Pest Management Reviews, Oxford, v. 5, n. 4, p. 255-295, jan. 2000.

MUIR, L. E.; KAY, B. H.; THORNE, M. J. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vision: response to stimuli from the optical environment. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 29, n. 3, p. 445-450, sep. 1992.

MULLA, M. S. et al. Larvicidal activity and field efficacy of *Bacillus sphaericus* strains against mosquito larvae and their safety to nontarget organisms. Mosquito News, New York v. 44, n. 3, p. 336-342, set. 1984.

MULLAN, S. et al. Mosquito larval control with *Bacillus sphaericus*: reduction in adult populations in low-income communities in Nonthaburi Province, Thailand. Journal of Vector Ecology, Santa Ana, v. 26, p. 221-231, dec. 2001.

MULLA, M. S. et al. Emergence of resistance and resistance management in field populations of tropical *Culex quinquefasciatus* to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 19, n. 1, p. 39-46, mar. 2003.

MUSSO, D.; BAUD, D.; GUBLER, D. J. Zika virus: what do we know? Clinical Microbiology and Infection, London, v. 22, n. 6, p. 494-496, jun. 2016.

- MWANGANGI, J. M. et al. Wide-scale application of Bti/Bs biolarvicide in different aquatic habitat types in urban and peri-urban Malindi, Kenya. Parasitology Research, Berlim, v. 108, n. 6, p. 1355-1363, jun. 2011.
- NARAHASHI, T. Nerve membrane ionic channels as the primary target of pyrethroids. Neurotoxicology, Netherlands, v. 6, n. 2, p. 3, 1985.
- NAVARRO-SILVA, M. A. et al. Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of Culicidae. Revista Brasileira de Entomologia, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 1-6, 2009.
- NICOLAS, L. et al. Respective role of the 42-and 51-kDa components of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiology Letters, Oxford, v. 106, n. 3, p. 275-279, fev. 1993.
- NIELSEN-LEROUX, C. et al. Priority Paper Resistance in a laboratory population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus* binary toxin is due to a change in the receptor on midgut brush-border. European Journal of Biochemistry, Berlim, v. 228, n. 1, p. 206, jul. 1995.
- NIELSEN-LEROUX, C. et al. Resistance to *Bacillus sphaericus* involves different mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) larvae. Journal of Medical entomology, Honolulu, v. 34, n. 3, p. 321-327, may. 1997.
- NIELSEN-LEROUX, C. et al. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of west Mediterranean countries. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 39, n. 5, p. 729-735, jan. 2002.
- NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. European Journal of Biochemistry, Berlim, v. 210, n. 2, p. 585-590, dez. 1992.
- NORMILE, D. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. Science, Cambridge v. 342, n. 6157, p. 415-415, out. 2013.
- OCHOA-CAMPUZANO, C. et al. An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. Biochemical and Biophysical Research Communications, São Diego, v. 362, n. 2, p. 437-442, out. 2007.
- OLIVEIRA, C. M. F. et al. Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from China and Brazil. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 41, n. 1, p. 58-64, jan. 2004.
- OPOTA, O. et al. *Bacillus sphaericus* binary toxin elicits host cell autophagy as a response to intoxication. PLoS One, San Francisco, v. 6, n. 2, p. e14682, fev. 2011.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Eliminação de doenças negligenciadas e outras infecções relacionadas à pobreza. Washington, 2014.



ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global programme to eliminate lymphatic filariasis. Weekly epidemiological Record, Geneva, v.85, n. 38, p. 365-372, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global programme to eliminate lymphatic filariasis. Weekly epidemiological Record, Geneva, v. 81, n. 22, p. 221-232, 2006.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Fortalecimento da vigilância para alcançar e manter a eliminação da transmissão da filariose linfática e combater outras doenças infecciosas negligenciadas na Região das Américas. In: REGIONAL PROGRAM MANAGER'S MEETING, 4., 2015, Recife. Proceedings... Washington, 2015. (Technical Reports).

PARK, H. et al. Recombinant larvicidal bacteria with markedly improved efficacy against *Culex* vectors of West Nile virus. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 72, n. 6, p. 732-738, jun. 2005.

PEI, G. et al. A strain of *Bacillus sphaericus* causes slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 68, n. 6, p. 3003-3009, jun. 2002.

PENNA, M. L. F. Um desafio para a saúde pública brasileira: o controle do dengue Dengue control: a challenge for the public health system in Brazil. Caderno Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 305-309, jan./fev. 2003.

PERERA, M. et al. Neglected patients with a neglected disease? A qualitative study of lymphatic filariasis. PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 1, n. 2, p. e128, nov. 2007.

PÉREZ, C. et al. *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 102, n. 51, p. 18303-18308, dec. 2005.

PÉREZ, C. et al. *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. Cellular Microbiology, Malden, v. 9, n. 12, p. 2931-2937, 2007.

PERNAMBUCO. Secretaria de Estado de Saúde. Abastecimento de água e esgotamento sanitário nas capitais brasileiras, em 2004. Recife, 2004. Disponível em: <[http://www.socioambiental.org/banco\\_imagens/pdfs/AbastEsgotBrasilNov07.pdf](http://www.socioambiental.org/banco_imagens/pdfs/AbastEsgotBrasilNov07.pdf)>. Acessado em 10 dez. 2016.

PERNAMBUCO. Secretaria de Estado de Saúde. Projeto SANAR: Doenças negligenciadas, 2011. Recife, 2011. Disponível em: <<http://portal.saude.pe.gov.br/programas-e-acoas/control-de-doencas/projeto-sanar-doencas-negligenciadas>>. Acesso em: 13 out. 2015>.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Washington, v. 71, n. 2, p. 255-281, dez. 2007.

PORTER, K. R.; TENEZA-MORA, N.; RAVIPRAKASH, K. Tetravalent DNA Vaccine Product as a Vaccine Candidate against Dengue. DNA Vaccines: Methods and Protocols, New York, p. 283-295, 2014.

RAMAIAH, K. D.; DAS, P. K. Seasonality of adult *Culex quinquefasciatus* and transmission of bancroftian filariasis in Pondicherry, South India. Acta Tropica, Basel, v. 50, n. 4, p. 275-283, abr. 1992.

RAO, D. R. et al. Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 11, n. 1, p. 1-5, 1995.

REGIS, L. et al. Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 90, n. 1, p. 115-119, 1995.

REGIS, L. et al. Integrated control of the filariasis vector with community participation, in an urban área of Recife. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 12, p. 473-482, out./dez. 1996.

REGIS, L. et al. Efficacy of *Bacillus sphaericus* in control of the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Olinda, Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 94, n. 5, p. 488-492, sep./oct. 2000.

REGIS, L. et al. Bacteriological Larvicides for Vector Control: Fundamental and Practical Aspects. Trends Parasitology, New York, v. 17, n. 8, p. 377-380. 2001.

REGIS, L. et al. Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 103, n. 1, p. 50-59, fev. 2008.

REGIS, L. N. et al. Sustained reduction of the dengue vector population resulting from an integrated control strategy applied in two Brazilian cities. PLoS One, San Francisco, v. 8, n. 7, p. e67682, jul. 2013.

REGIS, L. N. et al. Characterization of the spatial and temporal dynamics of the dengue vector population established in urban areas of Fernando de Noronha, a Brazilian oceanic island. Acta Tropica, Basel, v. 137, p. 80-87, set. 2014.

REITER, P.; AMADOR, M. A.; COLON, N. Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusion for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 7, p. 52-55, mar. 1991.

RIBEIRO, A. F. et al. Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 671-676, mar. 2006.

RIGAU-PÉREZ, J. G. et al. Dengue and dengue haemorrhagic fever. The Lancet, Amsterdam v. 352, n. 9132, p. 971-977, set. 1998.

RÍOS-VELÁSQUEZ, C. M. et al. Distribution of dengue vectors in neighborhoods with different urbanization types of Manaus, state of Amazonas, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 102, n. 5, p. 617-623, 2007.

ROBERTS, R.; TREN, D. DDT and malaria prevention. Environmental Health Perspectives, Nova York v. 118, n. 1, p. A14, set. 2010.

RODRIGUES, I. B. et al. Studies on the *Bacillus sphaericus* larvicidal activity against malarial vector species in Amazonia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 93, n. 4, p. 441-444, aug. 1998.

ROMÃO, T. P. et al. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its  $\alpha$ -glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. FEBS Journal, Bethesda, v. 273, n. 7, p. 1556-1568, set. 2006.

ROMÃO, T. P.; DE-MELO-NETO, O. P.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. The N-terminal third of the BinB subunit from the *Bacillus sphaericus* binary toxin is sufficient for its interaction with midgut receptors in *Culex quinquefasciatus*. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 321, n. 2, p. 167-174, aug. 2011.

ROTH, D. et al. West Nile Virus Range Expansion into British Columbia. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 16, n. 8, p. 1251, ago. 2010.

RUIGT, G. S. F. et al. Increase of sodium current after pyrethroid insecticides in mouse neuroblastoma cells. Brain Research, Amsterdam v. 437, n. 2, p. 309-322, ago. 1987.

SAENGWIMAN, S. et al. In vivo identification of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptors by RNA interference knockdown of glycosylphosphatidylinositol-linked aminopeptidase N transcripts in *Aedes aegypti* larvae. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, v. 407, n. 4, p. 708-713, abr. 2011.

SAMY, A. M. et al. Climate change influences on the global potential distribution of the mosquito *Culex quinquefasciatus*, vector of west Nile virus and lymphatic filariasis. PloS One, San Francisco, v. 11, n. 10, p. e0163863, oct. 2016.

SANTOS, E.M. M. et al. Oviposition activity of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) in response to different organic infusions. Neotropical Entomology, Londrina, v. 39, n. 2, p. 299-302, abr. 2010.

SANTOS, E. M. M. et al. Evaluation of a sticky trap (AedesTraP), made from disposable plastic bottles, as a monitoring tool for *Aedes aegypti* populations. Parasites & Vectors, London, v. 5, n. 1, p. 195, sep. 2012.

SANTOS, S. A.; BARBOSA, R. M. R. Immature *Aedes* mosquitoes colonize *Culex quinquefasciatus* breeding sites in neighborhoods in the municipality of Olinda, State of Pernambuco. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 47, n. 6, p. 775-777, Nov./dec. 2014.

SANTOS, S. R. A. et al. Field evaluation of ovitraps consociated with grass infusion and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to determine oviposition rates of *Aedes aegypti*. Dengue Bulletin, Washington, v. 27, p. 156-162, 2003.

SAUVÉ, S.; DESROSIERS, M. A review of what is an emerging contaminant. Chemistry Central Journal, London, v. 8, n. 1, p. 1-7, fev. 2014.

SERPA, L. L. N.; MONTEIRO, S. D. B.; VOLTOLINI, J. C. Efeito da água de criação larval na oviposição de *Aedes aegypti* em laboratório. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 41, n. 5, p. 515-7, sep./out. 2008.

SERPA, L. L. N. et al. Study of the distribution and abundance of the eggs of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* according to the habitat and meteorological variables, municipality of Sao Sebastiao, Sao Paulo State, Brazil. Parasites & Vectors, London, v. 6, n. 1, p. 321, nov. 2013.

SERVICE, M. W. Medical Entomology for Students. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2004.

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 32, n. 4, p. 349-355, 1999.

SILVA-FILHA, M. H. et al. Low-level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-treated population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Journal of Economic Entomology, Oxford, v. 88, n. 3, p. 525-530, set. 1995.

SILVA-FILHA, M. H. et al. Impact of a 26-month *Bacillus sphaericus* trial on the preimaginal density of *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Recife, Brazil. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 17, n. 1, p. 45-50, mar. 2001

SILVA-FILHA, M. H. N. L.; PEIXOTO, C. A. Immunocytochemical localization of the *Bacillus sphaericus* binary toxin components in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. Pesticide Biochemistry and Physiology, New York, v. 77, n. 3, p. 138-146, nov. 2003.

SILVA-FILHA, M. H. N. L. et al. *Culex quinquefasciatus* field populations subjected to treatment with *Bacillus sphaericus* did not display high resistance levels. Biological Control, San Diego, 44, v. 44, n. 2, p. 227-234, fev. 2008.

SIMONSEN, P. E.; COOK, G. C.; ZUMLA, A. I. Manson's Tropical Diseases. London: Saunders Elsevier, 2009.

SIMONSEN, P. E.; MWAKITALU, M. E. Urban lymphatic filariasis. Parasitology Research, Berlim, v. 112, n. 1, p. 35-44, dez. 2013.

SINGKHAMANAN, K. et al. Amino acid residues in the N-terminal region of the BinB subunit of *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin play a critical role during receptor binding

and membrane insertion. Journal of Invertebrate Pathology, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 65-70, sep. 2013.

SINGER, S. Isolation and development of bacterial pathogens of vectors. In: Biological Regulation of Vectors. Bethesda, MD: National Institute of Health, 1977. p. 3-18.

SOBERÓN, M. et al. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. Toxicon, Oxford, v. 49, n. 5, p. 597-600, apr. 2007.

SPARKS, T. C. et al. Resistance and cross-resistance to the spinosyns—a review and analysis. Pesticide Biochemistry and Physiology, New York, v. 102, n. 1, p. 1-10, jan. 2012.

SRISUCHARITPANIT, K. et al. Crystal structure of BinB: A receptor-binding component of the binary toxin from *Lysinibacillus sphaericus*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, London, v. 82, n. 10, p. 2703-2712, oct. 2014.

STOOPS, C. A. Influence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on oviposition of *Aedes albopictus* (Skuse). Journal of Vector Ecology, Santa Ana, v. 30, n. 1, p. 41, aug. 2005.

SUTER, T. T. et al. Surveillance and control of *Aedes albopictus* in the Swiss-Italian border region: differences in egg densities between intervention and non-intervention areas. PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 10, n. 1, p. e0004315, jan. 2016.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue Urbanization and dengue ecology. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 17, p. 99-102, 2001.

TCHICAYA, E.; KOUDOU, B. G.; UTZINGER, J. Effect of repeated application of microbial larvicides on malaria transmission in central Côte d'Ivoire. Malaria Journal, London, v. 9, n. S2, p. 68, 2010.

TEIXEIRA, M. G. et al. The epidemic of Zika virus—related microcephaly in Brazil: detection, control, etiology, and future scenarios. American Journal of Public Health, Oxford, v. 106, n. 4, p. 601-605, maio 2016.

TETREAU, G. et al. Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field: evidence for spore recycling and differential persistence of toxins in leaf litter. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 78, n. 23, p. 8362-8367, dec. 2012.

THANABALU, T. Cloning and characterization of a gene encoding a 100 kDa toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1 and expression of insecticidal toxins in *Caulobacter crescentus*. 1992. Tese (Doutorado) - National University of Singapore, Singapore, 1992.

THANABALU, T. et al. Cloning, sequencing, and expression of a gene encoding a 100-kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. Journal of Bacteriology, New York, v. 173, n. 9, p. 2776-2785, 1991.

THANABALU, T.; PORTER, A. G. A *Bacillus sphaericus* gene encoding a novel type of mosquitocidal toxin of 31.8 kDa. Gene, Washington, v. 170, n. 1, p. 85-89, abr. 1996.

THIERY, I. et al. The introduction into *Bacillus sphaericus* of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* cyt1Ab1 gene results in higher susceptibility of resistant mosquito larva populations to *B. sphaericus*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 64, n. 10, p. 3910-3916, oct. 1998.

THORNE, L. et al. Structural similarity between the lepidoptera-and diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. "kurstaki" and "israelensis". Journal of bacteriology, Washington v. 166, n. 3, p. 801-811, jun. 1986.

TILAK, R. et al. A laboratory investigation into oviposition responses of *Aedes aegypti* to some common household substances and water from conspecific larvae. Medical Journal Armed Forces India, New Deli, v. 61, n. 3, p. 227-229, maio 2005.

UEJIO, C. K. et al. Biological Control of Mosquitoes in Scrap Tires in Brownsville, Texas, USA and Matamoros, Tamaulipas, Mexico. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 30, n. 2, p. 130-135, jun. 2014.

VADLAMUDI, R. K. et al. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 270, n. 10, p. 5490-5494, jul. 1995.

VALAITIS, A. P. et al. Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, New York, v. 46, n. 4, p. 186-200, abr, 2001.

VAREJÃO, J. B. M. et al. *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) breeding sites in native bromeliads in Vitória City, ES. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 238-240, maio/jun. 2005.

VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 36, n. 2, p. 275-293, may/apr. 2003.

VAZQUEZ, P. G. M. et al. A new, cost-effective, battery-powered aspirator for adult mosquito collections. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 46, n. 6, p. 1256-1259, nov. 2009.

VEZZANI, D.; ALBICOCCO, A. P. The effect of shade on the container index and pupal productivity of the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* breeding in artificial containers. Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v. 23, n. 1, p. 78-84, 2009.

VIANNA, E. E. S.; COSTA, P. R. P.; RIBEIRO, P. B. Oviposição e longevidade de adultos do *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) em condições ambientais. Pelotas, RS. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 47-52, 1996.

VIJAYAKUMAR, K. et al. A study on container breeding mosquitoes with special reference to *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes albopictus* in Thiruvananthapuram district, India. Journal of Vector Borne Diseases, Delhi, v. 51, n. 1, p. 27, 2014.

- VIJVERBERG, H. P. M.; VANDEN BERCKEN, J. Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. Critical Reviews in Toxicology, London, v. 21, n. 2, p. 105-126, 1990.
- WACHIRA, S. W. et al. Comparative responses of ovipositing *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* females to the presence of *Culex* egg rafts and larvae. Medical and Veterinary Entomology, Malden, v. 24, n. 4, p. 369-374, dez. 2010.
- WATI, M. R.; THANABALU, T.; PORTER, A. G. Gene from tropical *Bacillus sphaericus* encoding a protease closely related to subtilisins from Antarctic bacilli. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, Amsterdam, v. 1352, n. 1, p. 56-62, mai.1997.
- WEILL, M. et al. Insecticide resistance in mosquito vectors. Nature, London, v. 423, n. 6936, p. 136-137, 2003.
- WEILL, M. et al. La résistance du moustique *Culex pipiens* aux insecticides. Médecine Sciences, Paris, v. 19, n. 12, p. 1190-1192, dec. 2003.
- WEISER, J. A mosquito-virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from northern Nigeria. Zentralblatt für Mikrobiologie, Stuttgart, v. 139, n. 1, p. 57-60, 1984.
- WICKREMESINGHE, R. S. B. et al. *Bacillus sphaericus* spore from Sri Lanka demonstrating rapid larvicidal activity on *Culex quinquefasciatus*. Mosquitoes News, Albany, v. 40, p. 387-389, set. 1980.
- WIRTH, M. C. et al. Laboratory selection for resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from California, USA. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 37, n. 4, p. 534-540, jul. 2000a.
- WIRTH, M. C. et al. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* Synergizes Activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 66, n. 3, p. 1093-1097, mar. 2000b.
- WIRTH, M. C. et al. Synergy between toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus*. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 41, n. 5, p. 935-941, sep. 2004.
- WIRTH, M. C. Mosquito resistance to bacterial larvicidal toxins. The Open Toxinology Journal, Netherlands, v. 3, n. 1, p. 126-140, dez. 2010.
- WIRTH, M. C.; FERRARI, J. A.; GEORGHIU, G. P. Baseline susceptibility to bacterial insecticides in populations of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) from California and from the Mediterranean Island of Cyprus. Journal of Economic Entomology, Oxford, v. 94, n. 4, p. 920-928, mar. 2001.
- ORAGNIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. Geneva, 2016. (Fact Sheet, n. 117).. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 19 dez. 2016.

- XU, X.; YU, L.; WU, Y. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 71, n. 948-954, fev. 2005.
- XU, Z. et al. Using an F2 screen to monitor frequency of resistance alleles to Bt cotton in field populations of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Pest Management Science, Washington, v. 65, n. 4, p. 391-397, jan. 2009.
- YANG, Y. et al. Proteolytic stability of insecticidal toxins expressed in recombinant bacilli. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 73, n. 1, p. 218-225, jan. 2007.
- YUAN, Z. et al. High-level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from Southern China. Biocontrol Science and Technology, Abingdon, v. 10, n. 1, p. 41-49, jun. 2000.
- YUAN, Z. et al. High-level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from Southern China. Biocontrol Science and Technology, Abingdon, v. 10, n. 1, p. 41-49, jun. 2000.
- ZAHIRI, N.; RAU, M. E.; LEWIS, D. J. Oviposition responses of *Aedes aegypti* and *Ae. atropalpus* (Diptera: Culicidae) females to waters from conspecific and heterospecific normal larvae and from larvae infected with *Plagiorchis elegans* (Trematoda: Plagiorchiidae). Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 34, n. 5, p. 565-568, set. 1997.
- ZAHIRI, Nayer S.; SU, Tianyun; MULLA, Mir S. Strategies for the management of resistance in mosquitoes to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. Journal of medical entomology, Honolulu, v. 39, n. 3, p. 513-520, jan. 2002
- ZHANG, Wenfei et al. Characterization of a new highly mosquitocidal isolate of *Bacillus thuringiensis*—An alternative to Bti? Journal of invertebrate pathology, New York, v. 109, n. 2, p. 217-222, fev. 2012.
- ZINSER, M.; RAMBERG, F.; WILLOTT, E. *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) as a potential West Nile virus vector in Tucson, Arizona: blood meal analysis indicates feeding on both humans and birds. Journal of Insect Science, Oxford, v. 4, n. 20, p. 1-3, jun. 2004.



## Apêndice A- Artigo publicado

# Novel Mutations Associated with Resistance to *Bacillus sphaericus* in a Polymorphic Region of the *Culex quinquefasciatus* *cqm1* Gene

Karlos Diogo de Melo Chalegre,<sup>a</sup> Tatiany Patrícia Romão,<sup>a</sup> Daniella Aliny Tavares,<sup>a</sup> Eloína Mendonça Santos,<sup>a</sup> Lígia Maria Ferreira,<sup>a</sup> Cláudia Maria Fontes Oliveira,<sup>a</sup> Osvaldo Pompílio de-Melo-Neto,<sup>b</sup> and Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha<sup>a</sup>

Department of Entomology<sup>a</sup> and Department of Microbiology,<sup>b</sup> Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, Recife-PE, Brazil

Bin toxin from *Bacillus sphaericus* acts on *Culex quinquefasciatus* larvae by binding to Cqm1 midgut-bound receptors, and disruption of the *cqm1* gene is the major cause of resistance. The goal of this work was to screen for a laboratory-selected resistance *cqm1*<sub>REC</sub> allele in field populations in the city of Recife, Brazil, and to describe other resistance-associated polymorphisms in the *cqm1* gene. The *cqm1*<sub>REC</sub> allele was detected in the four nontreated populations surveyed at frequencies from 0.001 to 0.017, and sequence analysis from these samples revealed a novel resistant allele (*cqm1*<sub>REC-D16</sub>) displaying a 16-nucleotide (nt) deletion which is distinct from the 19-nt deletion associated with *cqm1*<sub>REC</sub>. Yet a third resistant allele (*cqm1*<sub>REC-D25</sub>), displaying a 25-nt deletion, was identified in samples from a treated area exposed to *B. sphaericus*. A comparison of the three deletion events revealed that all are located within the same 208-nt region amplified during the screening procedure. They also introduce equivalent frameshifts in the sequence and generate the same premature stop codon, leading to putative transcripts encoding truncated proteins which are unable to locate to the midgut epithelium. The populations analyzed in this study contained a variety of alleles with mutations disrupting the function of the corresponding Bin toxin receptor. Their locations reveal a hot spot that can be exploited to assess the resistance risk through DNA screening.

The utilization of biolarvicides based on *Bacillus sphaericus* requires monitoring strategies which can predict or prevent potential resistance selection among exposed mosquito populations. The binary (Bin) crystal toxin, which is the major active insecticidal factor found in commercial *B. sphaericus* strains, acts on mosquito larvae after ingestion, processing and binding to specific receptors located on the midgut epithelium (5, 24). Bin toxin displays high activity against larvae of the *Culex pipiens* complex and *B. sphaericus* has an excellent persistence under field conditions, which make this an effective biolarvicide for controlling these species in urban areas (17). However, the mode of action of Bin toxin relies entirely on its binding to a single class of midgut receptors which are glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored  $\alpha$ -glucosidases named Cpm1 and Cqm1 for *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus*, respectively (7, 29, 30). Failure of toxins to bind to their midgut receptors has been described, in a wide range of target insects, as the primary resistance mechanism to insecticidal proteins from entomopathogenic bacteria (11, 16, 25). In the case of *B. sphaericus*, this is a critical aspect since resistance cases have also been reported after laboratory selection or field exposure (2, 25, 27, 36, 38, 44).

Investigation of the *B. sphaericus* resistance mechanisms has confirmed the essential role for the binding of Bin toxin to its receptors, since mutations within the *cpm1/cqm1* genes, which are recessively inherited, are the major causes leading to the absence of functional receptors in the midgut and consequent high resistance levels (36). Resistance cases unrelated to receptor binding failure were reported; however, the mechanisms involved were not elucidated to date (25). On the other hand, molecular characterization of resistance linked to *cpm1/cqm1* genes, performed in two laboratory-selected colonies and one field population, revealed four distinct alleles associated with this phenotype: *cpm1*<sub>GEO</sub> and *cqm1*<sub>REC</sub>, laboratory-selected alleles in California (GEO colony) and in Recife, Brazil (CqRL1/2362 colony), respectively, and *cpm1*<sub>BP</sub> and *cpm1*<sub>BP-del</sub>, both character-

ized in a field population from the south of France (6, 8, 29). Each allele displays distinct resistance-associated mutations which result in potential transcripts for truncated soluble proteins lacking the GPI anchor (*cpm1*<sub>GEO</sub>, *cqm1*<sub>REC</sub>, *cpm1*<sub>BP</sub>) or for truncated GPI-anchored proteins which are still unable to bind Bin toxin due to the loss of 66 amino acids (*cpm1*<sub>BP-del</sub>). The CqRL1/2362 colony, derived from eggs collected in the Recife Metropolitan Area (RMA; Brazil) and laboratory selected, displays high levels of resistance (resistance ratio [RR], >100,000) due to the failure of Bin toxin binding to microvillus receptors, and larvae from this colony were found to be homozygous for the *cqm1*<sub>REC</sub> allele (26, 27). Characterization of this allele showed a 19-nucleotide (nt) deletion which changes the frame of the protein coding sequence and originates a premature stop codon. The resulting predicted protein coded by this allele lacks part of its C-terminal end, including the GPI-anchor site. As a consequence, in individuals found to be homozygous for the *cqm1*<sub>REC</sub> allele, no functional polypeptide is present as a midgut membrane-bound receptor, a condition essential for Bin toxin binding (29). The characterization of this mutation allowed the development of a PCR amplification assay, which upon screening for *cqm1*<sub>REC</sub> in larva samples from RMA field populations, showed the presence of the associated deletion in a frequency on the order of 10<sup>-3</sup> and 10<sup>-2</sup> in nontreated and treated areas, respectively (4).

Utilization of *B. sphaericus* biolarvicides in RMA has been an

Received 13 April 2012 Accepted 25 June 2012

Published ahead of print 6 July 2012

Address correspondence to Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha, mhneves@cpqam.fiocruz.br.

Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.01199-12

important tool for controlling *C. quinquefasciatus*, which is the exclusive vector of the nematode *Wuchereria bancrofti* in Brazil (32). In view of the strategic role of this biolarvicide in RMA and the advantage provided by the knowledge available on the molecular basis of resistance, the goal of this work was to provide data on the frequency of the *cqm1*<sub>REC</sub> allele through DNA screening, as well as to describe novel polymorphisms of the *cqm1* gene which can disrupt the expression of the Cqm1 protein as a target site for Bin toxin. The search for new resistance-mediating events is a key step for the development and continuous improvement of molecular methods for resistance monitoring, since most alleles identified are recessively inherited and cannot be directly tracked through bioassays.

## MATERIALS AND METHODS

**Mosquito colonies.** Three colonies were used in this study: CqSF, a *Culex quinquefasciatus* colony susceptible to *Bacillus sphaericus* that was established from egg rafts collected in the Recife Metropolitan Area (RMA) in Brazil; CqRL1/2362, a *C. quinquefasciatus* colony derived from CqSF and laboratory selected with *B. sphaericus* strain 2362 that displays a high level of resistance (>100,000-fold) to this entomopathogen (27); and RecLab, an *Aedes aegypti* colony established from egg samples also collected in RMA (21). Colonies have been maintained in the insectarium of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ), under controlled conditions, for at least 8 years. Larvae were reared in dechlorinated tap water and fed with cat biscuits. Adults were fed on 10% sucrose solution, and females were also fed with chicken blood. Insects were maintained at 26 ± 1°C, 70% humidity, and a photoperiod of 12 h of light and 12 h of darkness.

***Culex quinquefasciatus* population.** Four nontreated populations and one treated population from RMA were investigated. Nontreated areas were Ipojuca (IPO) and Jaboatão (JAB), located 60 and 20 km from Recife, respectively, and Roda de Fogo (ROD) and Azeitona (AZE), districts within the city. Samples from IPO and JAB consisted of egg rafts, collected in 2010, using around 30 oviposition traps (3) randomly placed in households within each area. Samples from ROD and AZE, consisting of larva batches collected directly from breeding sites in these areas in 1999, were stored at -70°C. The treated area of Água Fria (AGU) has been exposed to *B. sphaericus* since 2003 (32), and egg rafts were collected in 2010 according to the methodology described above. Eggs were used to establish subcolonies maintained under laboratory conditions, and larvae from F1 or F2 progenies were stored at -70°C until use.

**Bioassays.** Multiple concentration bioassays were performed to establish the lethal concentrations of the *B. sphaericus* 2362 lyophilized powder SPH-88 (Institut Pasteur), after 48 h, for 50% (LC<sub>50</sub>) and 90% (LC<sub>90</sub>) of exposed larvae according to the standard procedure (35). Lethal concentrations were determined through probit analysis using the software SPSS 10.0 for Windows. Diagnostic dose bioassays were performed to discriminate susceptible and highly resistant individuals based on the exposure of individual fourth-instar larva samples to a high concentration of *B. sphaericus* 2362 for 48 h (1). Briefly, larvae were treated with 125 mg/liter of the biomass sample (sample no. 0448/09; CPqAM-FIOCRUZ) stored at -20°C, at a concentration more than 1,000-fold higher than the LC<sub>90</sub> to the CqSF-susceptible colony, in a final volume of 2 ml of distilled water in 24-well plates. This high diagnostic dose was chosen based on the fact that all *cqm1* resistance alleles already characterized confer total refractoriness to Bin toxin (25, 27, 38, 44).

**AS-PCR.** For DNA isolation, individual fourth-instar larva samples were homogenized in DNAzol (Invitrogen), as recommended by the manufacturer, followed by precipitation with ethanol and DNA recovering in Tris-EDTA buffer. Allele-specific PCR (AS-PCR) was performed using specific primers, described in Chalegre et al. (4), and reactions were carried out for 35 cycles with an annealing temperature of 60°C using a Biometra thermocycler. Amplification products were separated by elec-

TABLE 1 Toxicity of *B. sphaericus* strain 2362 against larvae<sup>a</sup>

Sample	No. of larvae	LC <sub>50</sub>		LC <sub>90</sub>	
		Mean (95% fiducial limits)	RR	Mean (95% fiducial limits)	RR
CqSF	360	0.004 (0.003–0.005)	1.0	0.029 (0.019–0.049)	1.0
IPO	1,480	0.013 (0.010–0.017)	3.3	0.029 (0.022–0.044)	1.0
JAB	1,480	0.017 (0.013–0.020)	4.3	0.026 (0.023–0.049)	0.9
AGU	1,140	0.024 (0.021–0.028)	6.0	0.050 (0.042–0.059)	1.7

<sup>a</sup> Larvae were fourth-instar *Culex quinquefasciatus* from a susceptible laboratory colony (CqSF), two nontreated populations (IPO, JAB), and one treated population exposed to *B. sphaericus* (AGU). Shown are lethal concentrations (mg/liter) for 50% (LC<sub>50</sub>) or 90% (LC<sub>90</sub>) of larvae after 48 h. RR, resistance ratio; LC for the population tested/LC for the CqSF reference colony.

trophoresis on 2.5% agarose gels, and each assay included no-DNA samples and *A. aegypti* DNA samples as negative controls. All AS-PCR products potentially amplified from the *cqm1*<sub>REC</sub> allele (fragments of less than 208 bp were expected due to the 19-nt deletion) and some fragments amplified from *cqm1* (standard fragments of 208 bp) were subjected to automatic sequencing in an ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems) to confirm their identity.

**Cloning and sequencing of *cqm1* alleles.** Genomic DNA from fourth-instar larvae was extracted as described, and PCRs were carried out with primers flanking the full-length coding sequence of *cqm1* (see Table S1 in the supplemental material) using Platinum *Taq* high-fidelity DNA polymerase (Invitrogen). To obtain the partial sequence of the *cqm1*<sub>REC-D25</sub> allele described in this study, a second set of primers were also used (see Table S1). PCR products were purified with the GFX DNA and gel band purification (GE Healthcare) kits. They were then ligated into the vector pGEM-T Easy (Promega) and subsequently transformed into the One Shot TOP10 chemically competent *Escherichia coli* cells (Invitrogen). Twelve clones from each sample were subjected to minipreparations in Luria-Bertani medium supplemented with ampicillin (100 µg/ml) and further purified with the QIAprep spin miniprep kit (Qiagen). After purification, the DNA samples were quantified and submitted for automatic sequencing. Alignment and assembly of the resulting nucleotide and amino acid sequences were performed with the DNASTAR software package, and manual refinement was done when needed.

## RESULTS

Available data on the frequency of resistance alleles in field populations without a history of previous spraying remain scarce, and the lack of baseline information is one of the most limiting factors to evaluate resistance selection and to introduce management strategies. For this reason, an AS-PCR assay for the detection of *cqm1*<sub>REC</sub>, designed and evaluated previously (4), was applied to identify genotypes of *C. quinquefasciatus* larvae from nontreated populations of RMA. First, *B. sphaericus* susceptibility was investigated in field populations from IPO and JAB using *in vivo* bioassays. Multiple dose-response assays showed that larvae from both samples were susceptible since only a discrete increase in the LC<sub>50</sub>, with a resistance ratio (RR) around 3- and 4-fold for IPO and JAB, respectively, was observed and the LC<sub>90</sub> showed similarities with the reference colony (Table 1). Diagnostic dose bioassays were also performed in an attempt to identify larva survivors from a high concentration of *B. sphaericus* that could potentially be homozygous-allele-resistant individuals. Samples of 1,680 and 720 larvae for IPO and JAB, respectively, were individually exposed, and there was no detection of survivors from these bioassays. Full mortality was already achieved after 24 h of *B. sphaericus* exposure in the treated groups, while the nontreated larvae from

TABLE 2 Frequency of *cqm1* alleles determined by PCR<sup>a</sup>

Sample	Yr	Total no. of larvae	No. of larvae with genotype and frequency of each allele											
			<i>cqm1</i>			<i>cqm1</i> <sub>REC</sub>			<i>cqm1</i> <sub>REC-D16</sub>			<i>cqm1</i> <sub>REC-D25</sub>		
			SS	SR	RR	F	SR	RR	F	SR	RR	F		
IPO	2010	501	498	3	0	0.003	0	0	0	0	0	0	0	
JAB	2010	510	507	1	0	0.001	1	1	0.003	0	0	0	0	
ROD	1999	230	222	8	0	0.017	0	0	0	0	0	0	0	
AZE	1999	240	236	1	0	0.002	3	0	0.006	0	0	0	0	
AGU	2010	269	252	14	2	0.033	0	0	0	1	0	0.002	0	

<sup>a</sup> Frequency of *cqm1* alleles in *Culex quinquefasciatus* larvae from four nontreated populations (IPO, JAB, ROD, AZE), as well as one treated population exposed to *B. sphaericus* (AGU). SS, homozygous for *cqm1*; SR and RR, heterozygous or homozygous for one of the resistance (*r*) alleles, respectively; F, allele frequency.

the control groups showed 2.9 and 1.7% mortality for IPO and JAB, respectively, after the standard period of 48 h of exposure. ROD and AZE larva susceptibilities were not analyzed since these samples were collected in 1999 and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  without further evaluation.

The AS-PCR performed in this study is based on the fact that according to the size of the DNA fragment amplified, using two primers flanking the 19-nt deletion which characterizes the *cqm1*<sub>REC</sub> allele, it is possible to identify fragments derived from either *cqm1* or the *cqm1*<sub>REC</sub> resistant allele, corresponding to 208 or 189 bp, respectively (4). Here we define *cqm1* as all alleles other than *cqm1*<sub>REC</sub> taking into account that it is not possible to exclude the existence of unknown resistance mutations which are located outside the region under evaluation or do not alter the size of the amplified fragment. All populations analyzed here, which had no history of *B. sphaericus* spraying, nonetheless showed the presence of the *cqm1*<sub>REC</sub> allele. Frequencies of 0.003, 0.001, and 0.002 were detected in IPO, JAB, and AZE, respectively, whereas ROD showed a higher frequency of 0.017 (Table 2). In these populations, the *cqm1*<sub>REC</sub> allele was always found in heterozygous individuals, whereas most individuals were homozygous for the *cqm1* allele (Fig. 1; Table 2).

Screening for the *cqm1*<sub>REC</sub> allele involved sequencing of all amplified diagnostic fragments (<208 bp) potentially corresponding to this allele in order to confirm their identity. The analysis of the resulting sequences revealed not only the targeted *cqm1*<sub>REC</sub> 19-nt deletion but also a second deletion located in the same region encompassed by the amplified fragment. The new polymorphism found in these nontreated populations consists of a 16-nt deletion

(nt 1306 to 1321), located 12 nucleotides downstream of the *cqm1*<sub>REC</sub> deletion (nt 1276 to 1294), and this allele was denominated *cqm1*<sub>REC-D16</sub> (Fig. 2). Visual inspection of diagnostic fragments provided by AS-PCR does not allow a reliable distinction between products amplified from *cqm1*<sub>REC</sub> or *cqm1*<sub>REC-D16</sub> alleles (Fig. 1). The *cqm1*<sub>REC-D16</sub> allele was detected in both JAB and AZE samples. In JAB, its frequency of 0.003 was based on the finding of one heterozygote and one homozygote larva sample for this allele detected among 510 individuals analyzed, whereas in AZE, its frequency was 0.006, carried by only one heterozygous larva sample found among 240 larva samples (Table 2). The frequency of each *cqm1*<sub>REC</sub> or *cqm1*<sub>REC-D16</sub> allele in 1,481 larva samples from all nontreated populations was 0.004 or 0.002, respectively, while the frequency of both was 0.006.

The DNA segment where the two deletions described above were found may be a hot spot for these kinds of mutations since a third deletion was detected in individuals from AGU, a treated area exposed to *B. sphaericus*. Resistance ratios for AGU larvae were 6- and 1.7-fold at LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub>, respectively. The AS-PCR screening based on a sample of 269 larvae showed a frequency of 0.033 for *cqm1*<sub>REC</sub> and this allele was carried by heterozygous and homozygous larvae. The sequence analysis of the set of smaller-sized diagnostic fragments amplified from this AGU sample showed, besides the fragments containing the 19-nt deletion, one heterozygous individual for an allele containing a 25-nt deletion encompassing the 19-nt deletion for the *cqm1*<sub>REC</sub> allele, plus the six subsequent bases (Fig. 2). The allele presenting this new deletion, comprising nucleotides 1276 to 1300, was denominated *cqm1*<sub>REC-D25</sub>, and visual inspection of the corresponding fragment generated by AS-PCR also does not allow a reliable distinction compared to alleles containing the *cqm1*<sub>REC</sub> or *cqm1*<sub>REC-D16</sub> deletion (Fig. 1).

The DNA extracted from larvae carrying the *cqm1*<sub>REC-D16</sub> allele was used for cloning and sequencing of the entire *cqm1* coding sequence in order to confirm its identity and analyze the whole sequence. For this purpose, 45 clones from 5 larva samples were analyzed, and among them, 21 were positive for the *cqm1*<sub>REC-D16</sub> allele. The final sequence from the individuals carrying such a copy contained the two known introns of 50 and 55 bp, with an open reading frame of 1,727 bp in length. A total of 43 other single nucleotide differences were found throughout the sequence. Among them, 7 led to amino acid substitutions in the deduced protein (see Table S2 in the supplemental material); however, none of these is known to be associated with the capacity of Cqm1 to bind Bin toxin. The full-length sequence of the *cqm1*<sub>REC-D25</sub> allele could not be amplified from

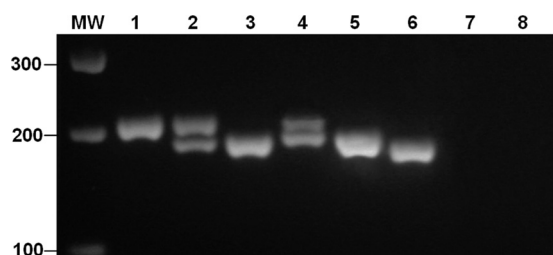
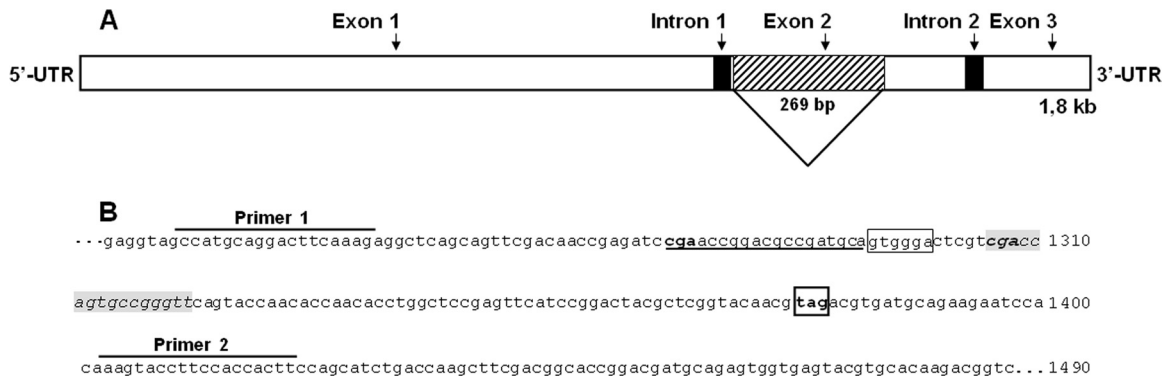


FIG 1 Fragments amplified from alleles of the *Culex quinquefasciatus* *cqm1* gene. PCR produces profiles of homozygous for *cqm1* (lane 1), heterozygous for *cqm1*<sub>REC</sub> (lane 2), homozygous for *cqm1*<sub>REC</sub> (lane 3), heterozygous for *cqm1*<sub>REC-D16</sub> (lane 4), homozygous for *cqm1*<sub>REC-D16</sub> (lane 5), and homozygous for *cqm1*<sub>REC-D25</sub> (lane 6). No fragments were amplified from samples with *Aedes aegypti* DNA (lane 7) or without DNA (lane 8). Molecular size markers (molecular weight [MW]) in base pairs are shown on the left.



**FIG 2** Representation of the *cqm1* gene encoding the Cqm1 receptor in *Culex quinquefasciatus* larvae (GenBank accession number [DQ333335](#)). (A) Full-length sequence of 1,848 nucleotides (nt) containing two introns of 50 nt (nt 1169 to 1218) and 55 nt (nt 1655 to 1709). (B) Nucleotide sequence from the region (nt 1221 to 1490) encompassing the polymorphisms found in alleles from Recife populations are indicated as follows: deletion of 19 nt corresponding to the *cqm1*<sub>REC</sub> allele is underlined; the six extra bases corresponding to the *cqm1*<sub>REC-D25</sub> are boxed; and the 16-nt deletion from the *cqm1*<sub>REC-D16</sub> allele, located 11 bases beyond the 19-nt deletion, is in italics and shaded in gray. Deletions start with a CGA trinucleotide motif in bold. The premature translation stop codon originating from the deletions described here is boxed in bold. For the allele-specific PCR, primers 1 and 2 were used for the 5' and 3' ends, respectively. These deletions were identified based on the sequencing of one strand of multiple DNA clones, which yielded identical results.

the same larva genomic DNA which originally generated the PCR fragment of 183 nt containing the 25-nt deletion. Despite extensive trials using the primers available for amplifying the full-length sequence, and even additional primers designed for this purpose (see Table S1 in the supplemental material), only the wild-type *cqm1* sequences without any deletions were found after analyzing the sequences of over 100 clones. Nevertheless, PCR assays using yet another set of primers (see Table S1, primers F4 and R4) resulted in the amplification of an 889-nt fragment whose sequence contained the 25-nt deletion. This sequence corresponded to about 50% of the full-length gene (positions 506 to 1419) and included the first intron; however, contrary to the sequence established for the *cqm1*<sub>REC-D16</sub> allele, single nucleotide polymorphisms compared to the previously described *cqm1* sequence (GenBank accession number [DQ333335](#)) were not found. Despite the high conservation of this 889-bp fragment, the failure to amplify a full-length copy of the *cqm1*<sub>REC-D25</sub> allele suggests the existence of polymorphisms in other regions of its sequence which would prevent annealing of the available primers.

The two deletion events found in the *cqm1*<sub>REC-D16</sub> and *cqm1*<sub>REC-D25</sub> alleles change the reading frame of the succeeding amino acids, and both originate a premature stop codon at position 1362, which is also the same stop codon created by the 19-nt deletion from the *cqm1*<sub>REC</sub> allele (Fig. 2). The resulting sequence from *cqm1*<sub>REC-D16</sub> and *cqm1*<sub>REC-D25</sub> alleles potentially encodes a truncated (437 amino acids long) protein. Both the 16- and 25-nt deletions can confer resistance, in homozygous individuals for any of these alleles, since they will not code for full GPI-anchored Cqm1 proteins, available in the midgut epithelium for the Bin toxin to bind. Comparative analysis of the three deletion events affecting the *cqm1* gene highlighted the fact that while the 19- and 25-nt deleted segments share the same initial insertion point in the sequence (at nucleotide 1276), all three also start with a common CGA trinucleotide motif.

## DISCUSSION

In this study, a DNA screening was performed to detect the *cqm1*<sub>REC</sub> allele in populations of *C. quinquefasciatus* from the Re-

cife Metropolitan Area (RMA). Susceptibility to *B. sphaericus* in two nontreated populations of IPO and JAB showed that RR values at the LC<sub>90</sub> were similar to that of the reference colony, and the slight variations in RRs found at the LC<sub>50</sub> are comparable to previous RRs reported for other nontreated mosquito populations, which have demonstrated the existence of natural variations in their *B. sphaericus* susceptibilities (4, 20, 34, 36, 37). The status of two other nontreated populations of ROD and AZE could not be analyzed; nevertheless, they were expected to be susceptible since *B. sphaericus* had not been used in these areas and they were also geographically isolated from the only two exposed areas in RMA at the time the samples were collected (28, 31). The *cqm1*<sub>REC</sub> allele was found in all nontreated populations analyzed, despite being originally identified in a laboratory-selected colony (4, 29), highlighting the strategic importance of monitoring for this allele in RMA. This result contrasts with those observed for laboratory-selected cadherin alleles associated with Cry1Ac resistance and whose screening in field populations has not led to a positive detection (13, 33). The frequency of the *cqm1*<sub>REC</sub> allele found among the populations analyzed, which was on the order of 10<sup>-3</sup> (0.001 to 0.003), is consistent with the previous screening of two nontreated RMA populations (4) and with studies on *Bacillus thuringiensis* (Bt) resistance genes in Lepidoptera that have estimated the initial frequency of such alleles in nonexposed populations as 0.0015 (15). However, the higher frequency observed for the ROD population indicates that variations in pretreatment frequency can occur and should be taken into account for evaluating the resistance risk prior to spraying. Recent surveys of Bt resistance genes in lepidopteran field populations from Bt cotton areas in China also showed a wide range of frequencies from 10<sup>-4</sup> to 10<sup>-1</sup> (14, 18, 19, 40, 45), with the latter being considered the first substantial increase in resistance gene frequency among the areas under study. The treated population of AGU evaluated here showed a higher *cqm1*<sub>REC</sub> frequency than those from the nontreated populations, which is consistent with *B. sphaericus* exposure in that area. However, this frequency has not increased compared to previous screenings performed in AGU (4, 32), suggesting that the selection pressure might be low. This could be related with the introduction of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (*B. thurin-*

*giensis* subsp. *israelensis*) to replace *B. sphaericus* in certain stages of this control program (C. M. F. Oliveira, personal communication). Considering that *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* does not display cross-resistance with *B. sphaericus* and it is able to eliminate resistant genotypes (27, 36, 43), this could be one reason for reducing the selection pressure in that area.

Molecular biology-based methods can be useful for monitoring early selection of resistance in field populations since known resistance alleles carried by heterozygous individuals can be directly identified. Screening performed in this study revealed two novel polymorphisms in the *cqm1* gene, 16- and 25-nt deletions found at the same region which encompasses the 19-nt deletion originally found in *cqm1*<sub>REC</sub>. The finding of one homozygous larva sample for *cqm1*<sub>REC-D16</sub> in the JAB population was not expected, considering its status of being a nontreated population, since data from a previous screening of *B. sphaericus* and Bt resistance alleles have shown such alleles only in heterozygous individuals under such conditions (4, 42, 45). The resistance phenotype conferred by *cqm1*<sub>REC-D16</sub> and *cqm1*<sub>REC-D25</sub> alleles could not be experimentally confirmed; nevertheless, the functional effect of these deletions on larva susceptibility is likely similar to that of *cqm1*<sub>REC</sub>, since they all provoke frameshifts and introduce the same premature stop codon in the sequence, which prevents the expression of full-length GPI-anchored proteins (6, 8, 29). Regardless of the fact that the Bin binding epitope on the Cqm1 protein is still unknown, the loss of the GPI anchor prevents its location on the midgut epithelium and, consequently, its function as the Bin toxin receptor.

A comparable situation, involving a wide range of polymorphisms, has been investigated in Lepidoptera cotton pests which display multiple cadherin alleles associated with Cry1Ac toxin resistance (12, 22, 45). To date, 12 cadherin alleles were found to be genetically linked to Cry1Ac toxin resistance, one from a laboratory-selected strain of *Heliothis virescens*, three from *Pectinophora gossypiella*, and eight alleles detected in *Helicoverpa armigera* (the last two species are from field populations) (12, 22, 23, 39, 42, 45). From the functional point of view, many of them are considered null alleles since they are disrupted by events which result in the generation of premature stop codons or aberrant splicing events in their sequences, expected to encode truncated proteins lacking toxin binding sites or the transmembrane domain (39, 42, 45). In these cases, the final result is an inability of the toxin to bind to its target tissue in a fashion similar to that observed for the *cqm1* resistance alleles described here (10, 45). In terms of monitoring tools, DNA screening of cadherin alleles has been considered a complex task due to the diversity and multiple locations of events found over genes that can be as large as 16 kb, as was seen for *H. armigera* (41). In contrast, the *cqm1* gene is around 1.8 kb (29), a size which facilitates its amplification and sequencing and allows DNA screening of coexisting, resistance-linked alleles in field populations.

The finding of novel events in the *cqm1* gene associated to *B. sphaericus* resistance and mapped to the same region where other resistance mutations have been identified suggests the existence of a hot spot for such events. Aside from the polymorphisms recorded in RMA in Brazil, the same gene region is also the target of the mutations which characterize the *cpm1*<sub>BP</sub> and *cpm1*<sub>BP-del</sub> resistance alleles, which were found to coexist in a *C. pipiens* population from France (6). Overall, five of six resistance alleles characterized in *cpm1/cqm1* genes have mutations located within this region, and only a single nonsense mutation (T1706A), from the

*cpm1*<sub>GEO</sub> allele (California), is mapped outside (8). From the evolutionary point of view, further studies are needed in order to clarify the mechanisms responsible for the rise of such events in this specific region of the *cqm1* gene, as well as the impact of these alleles on the biological performance of the targeted insects. Although resistance in individuals from the CqRL1/2362 colony was related to a discrete reduction of some biological parameters (9), this colony has been maintained in the laboratory for more than 10 years and recent data have shown that the *cqm1*<sub>REC</sub> allele is able to compete with *cqm1*, at least under laboratory conditions (1). Similarly, cadherin genes, in view of null alleles found associated with Cry1Ac resistance, do not seem to be essential for the survival of *H. virescens*, *P. gossypiella*, and *H. armigera* (12, 22, 45). In conclusion, the findings from this work indicate a diversity of polymorphisms for the *cqm1* gene which can lead to a loss of function as the receptor for the *B. sphaericus* Bin toxin. The events behind these polymorphisms, detected in individuals from field populations of RMA, are nevertheless located in a specific region of the *cqm1* gene, which allows for easy screening of the multiple events and is useful for assessing the resistance risk.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by “Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde (PAPES)” from Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq Brazil, grant 403488/2008-7), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE Brazil, grant APQ 0427-2.13/08).

We thank Andréa Neves Guedes de Souza and Liliane Barbosa Amorim (CPqAM-FIOCRUZ) for the insectarium support and the Program for Technological Development in Tools for Health PDTIS-FIOCRUZ for the use of its facilities.

#### REFERENCES

1. Amorim LB, et al. 2010. Stability of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* evaluated by molecular tools. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40:311–316.
2. Amorim LB, Oliveira CMF, Rios EM, Regis L, Silva-Filha MHNL. 2007. Development of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* strain IAB59 needs long term selection pressure. *Biol. Control* 42:155–160.
3. Barbosa RM, Souto A, Eiras AE, Regis L. 2007. Laboratory and field evaluation of an oviposition trap for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102:523–529.
4. Chalegre KD, et al. 2009. Detection of an allele conferring resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex quinquefasciatus* populations by molecular screening. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1044–1049.
5. Charles JF, Nielsen-LeRoux C, Delecluse A. 1996. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. *Annu. Rev. Entomol.* 41: 451–472.
6. Darboux I, Charles JF, Pauchet Y, Warot S, Pauron D. 2007. Transposon-mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Cell. Microbiol.* 9:2022–2029.
7. Darboux I, Nielsen-LeRoux C, Charles JF, Pauron D. 2001. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31:981–990.
8. Darboux I, et al. 2002. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:5830–5835.
9. de Oliveira CM, Filho FC, Beltran JE, Silva-Filha MH, Regis L. 2003. Biological fitness of a *Culex quinquefasciatus* population and its resistance to *Bacillus sphaericus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 19:125–129.
10. Fabrick JA, Mathew LG, Tabashnik BE, Li X. 2011. Insertion of an intact CR1 retrotransposon in a cadherin gene linked with Bt resistance in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella*. *Insect Mol. Biol.* 20:651–665.
11. Ferré J, Van Rie J. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47:501–533.

12. Gahan LJ, Gould F, Heckel DG. 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293:857–860.
13. Gahan LJ, Gould F, Lopez JD, Jr, Micinski S, Heckel DG. 2007. A polymerase chain reaction screen of field populations of *Heliothis virescens* for a retrotransposon insertion conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin. *J. Econ. Entomol.* 100:187–194.
14. Gao Y, Wu K, Gould F. 2009. Frequency of Bt resistance alleles in *H. armigera* during 2006–2008 in Northern China. *Environ. Entomol.* 38:1336–1342.
15. Gould F, et al. 1997. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:3519–3523.
16. Heckel DG, et al. 2007. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *J. Invertebr. Pathol.* 95:192–197.
17. Lacey LA. 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23:133–163.
18. Liu F, et al. 2008. Resistance allele frequency to Bt cotton in field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in China. *J. Econ. Entomol.* 101:933–943.
19. Liu F, et al. 2010. Evidence of field-evolved resistance to Cry1Ac-expressing Bt cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China. *Pest Manag. Sci.* 66:155–161.
20. Liu H, Cupp EW, Guo A, Liu N. 2004. Insecticide resistance in Alabama and Florida mosquito strains of *Aedes albopictus*. *J. Med. Entomol.* 41:946–952.
21. Melo-Santos MA, Araujo AP, Rios EM, Regis L. 2009. Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling. *Biol. Control* 49:186–191.
22. Morin S, et al. 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:5004–5009.
23. Morin S, et al. 2004. DNA-based detection of Bt resistance alleles in pink bollworm. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34:1225–1233.
24. Nielsen-Leroux C, Charles JF. 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.
25. Nielsen-Leroux C, et al. 2002. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of west Mediterranean countries. *J. Med. Entomol.* 39:729–735.
26. Oliveira CM, et al. 2004. Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from China and Brazil. *J. Med. Entomol.* 41:58–64.
27. Pei G, et al. 2002. A strain of *Bacillus sphaericus* causes slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3003–3009.
28. Regis L, et al. 1995. Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90:115–119.
29. Romão TP, et al. 2006. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its alpha-glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. *FEBS J.* 273:1556–1568.
30. Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Charles JF. 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.
31. Silva-Filha MH, Regis L, Oliveira CM, Furtado AE. 2001. Impact of a 26-month *Bacillus sphaericus* trial on the preimaginal density of *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Recife, Brazil. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 17:45–50.
32. Silva-Filha MHNL, et al. 2008. *Culex quinquefasciatus* field populations subjected to treatment with *Bacillus sphaericus* did not display high resistance levels. *Biol. Control* 44:227–234.
33. Tabashnik BE, et al. 2006. DNA screening reveals pink bollworm resistance to Bt cotton remains rare after a decade of exposure. *J. Econ. Entomol.* 99:1525–1530.
34. Vasquez MI, Violaris M, Hadjivassilis A, Wirth MC. 2009. Susceptibility of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) field populations in Cyprus to conventional organic insecticides, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, and methoprene. *J. Med. Entomol.* 46:881–887.
35. WHO. 1985. Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. TDR/BCV/SPHAERICUS/85.3.1–24. WHO, Geneva, Switzerland.
36. Wirth MC. 2010. Mosquito resistance to bacterial larvicidal toxins. *Open Toxinology J.* 3:101–115.
37. Wirth MC, Ferrari JA, Georghiou GP. 2001. Baseline susceptibility to bacterial insecticides in populations of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) from California and from the Mediterranean Island of Cyprus. *J. Econ. Entomol.* 94:920–928.
38. Wirth MC, Georghiou GP, Malik JJ, Abro GH. 2000. Laboratory selection for resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from California, USA. *J. Med. Entomol.* 37:534–540.
39. Xu X, Yu L, Wu Y. 2005. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac {delta}-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:948–954.
40. Xu Z, et al. 2009. Using an F(2) screen to monitor frequency of resistance alleles to Bt cotton in field populations of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag. Sci.* 65:391–397.
41. Yang Y, Chen H, Wu S, Xu X, Wu Y. 2006. Identification and molecular detection of a deletion mutation responsible for a truncated cadherin of *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36:735–740.
42. Yang Y, Chen H, Wu Y, Wu S. 2007. Mutated cadherin alleles from a field population of *Helicoverpa armigera* confer resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6939–6944.
43. Yuan ZM, Pei GF, Regis L, Nielsen-Leroux C, Cai QX. 2003. Cross-resistance between strains of *Bacillus sphaericus* but not *B. thuringiensis israelensis* in colonies of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Med. Vet. Entomol.* 17:251–256.
44. Yuan ZM, Zhang YM, Cai QX, Liu EY. 2000. High-level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from Southern China. *Biocontrol Sci. Technol.* 10:41–49.
45. Zhao J, Jin L, Yang Y, Wu Y. 2010. Diverse cadherin mutations conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40:113–118.